Einfluß einer Tumorbettvorbestrahlung auf Wachstum und Proliferationsverhalten des Harding-Passey-Melanoms der Maus

Ernst Holler

1981

Aus dem Strahlenbiologischen Institut

der Universität München

Vorstand: N.N.

Einfluß einer Tumorbettvorbestrahlung auf Wachstum und Proliferationsverhalten des Harding-Passey-Melanoms der Maus.

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin

an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Ernst Holler

aus

München

1981

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. K. R. Trott
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. J. Lissner
Dekan:	Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 20.10.1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

Die Möglichkeit zur Durchführung dieser Dissertation wurde mir von Herrn Prof. Dr. O. Hug (†) vermittelt. Sein Vorbild wird mir immer gegenwärtig sein.

Herr Prof. Dr. K.- R. Trott und Herr Dr. Kummermehr gaben die Anregung zu dieser Dissertation. In zahlreichen und anregenden Diskussionen waren sie mir eine große Hilfe bei Planung und Ausführung dieser Arbeit und der Erschließung strahlenbiologischer Kenntnisse. Für ihre ständige Bereitschaft zur Unterstützung bin ich ihnen zu großem Dank verpflichtet.

Für die sachkundige Hilfe bei der Durchführung praktischer Arbeiten und eine immer freundliche Hilfsbereitschaft danke ich allen Assistentinnen des Strahlenbiologischen Instituts.

Mein besonderer Dank richtet sich auch an Herrn Hietl und die Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Beschleuniger der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung für die wissenschaftliche und technische Betreuung der Bestrahlungsversuche am Beschleuniger. Herrn Panzer von der Abteilung Strahlenschutz danke ich für die Durchführung der hierzu notwendigen Dosimetrie.

Die großzügige Bereitstellung von Geräten und Versuchsmaterial durch die Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung in München-Neuherberg hat die Durchführung der Experimente dieser Arbeit erst ermöglicht.

Gewidmet meiner Frau Gisela

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
2.	MATERIAL, METHODEN, VERSUCHSANORDNUNG	5
2.1	Tiermaterial	
2.2	Tumormaterial	
2.3	Tumortransplantation	
2.3.1	Spenderauswahl und Aufarbeitung	
2.3.1.1	Unbehandelte Spender	
2.3.1.2	Rezidivierendes HPM als Spender	6
2.3.2	Transplantationsvorgang	
2.3.2.1	Transplantation auf unbehandelte Empfänger	
2.3.2.2	Transplantation in vorbestrahlte Gewebe	7
2.4	Messung des Tumorwachstums	
2.5	Kriterien für die Wertung transplantierter Tumoren	8
2.6	Tumor- und Tumorbettvorbestrahlung	9
2.6.1	Röntgenbestrahlung	
2.6.1.1	Vorüberlegungen	
2.6.1.2	Röntgenanlage und Dosimetrie	
2.6.1.3	Durchführung der Bestrahlung	10
2.6.2	Elektronenbestrahlung	
2.6.2.1	Vorüberlegungen	
2.6.2.2	Bestrahlungsanlage und Dosimetrie	11
2.6.2.3	Bestrahlungsvorrichtung und Durchführung	12
2.6.3	Messung der Hautreaktion nach Bestrahlung	
2.7	Histologische Techniken und Methoden	16
2.7.1	Aufarbeitung entnommener Tumoren für die Histologie	
2.7.2	Untersuchung der Zellproliferation	17
2.7.2.1	Markierung der Tumoren mit Tritium-Thymidin	
2.7.2.2	Autoradiographie	
2.7.2.3	Auswertung der Autoradiogramme	
2.7.2.4	Bestimmung des Markierungsindex	18
2.7.3	Morphometrische Methoden	19

		Seite
2.7.3.1	Bestimmung der Flächenanteile nekrotischen Gewebes im Tumorpräparat	19
2.7.3.2	Serienschnitte	
2.8	Versuchsanordnung	20
2.8.1	Wachstumsbeobachtung	
2.8.1.1	Vorüberlegungen zur Bildung der Versuchsgruppen	
2.8.1.2	Kontrollen	
2.8.1.3	Darstellung des Zeitverlaufs des Tumorbetteffekts	
2.8.1.4	Wachstum des rezidivierenden HPM im vorbestrahlten Feld	22
2.8.1.5	Tumorbestrahlung in situ	23
2.8.1.6	Vorversuch zur Bestimmung der Relativen Biologischen Wirksamkeit von 1 MeV Elektronen an der Haut	
2.8.1.7	Untersuchungen zur Abhängigkeit des Tumorbetteffekts vom bestrahlten Volumen	24
2.8.1.8	Untersuchungen zur Abhängigkeit des Tumorbetteffekts vom Bestrahlungs- und Transplantationssitus	25
2.8.2	Histologische, Morphometrische und Proliferations-kinetische Untersuchungen	
2.8.2.1	Histologische Auswertung	
2.8.2.2	Versuche zur Histogenese	26
3.	ERGEBNISSE	28
3.1	Wachstumsuntersuchungen	
3.1.1	Kurvenerstellung	
3.1.2	Wachstum im unbehandelten Transplantationssitus	
3.1.3	Wachstum des rezidivierenden HPM nach in situ Bestrahlung	31
3.1.4	Wachstum des unbehandelten HPM im vorbestrahlten Tumorbett (30 Gy/ 300 kV Röntgen)	32
3.1.5	Wachstum des rezidivierenden HPM im vorbestrahlten Tumorbett (30 Gy/ 300 kV Röntgen)	37
3.1.6	Kumulative Häufigkeit der Tumorverdopplungszeiten vorgestellter Versuchgruppen	39
3.1.7	Tumorbettbestrahlung mit 1 MeV Elektronen	41
3.1.7.1	Vergleich der akuten Hautreaktion nach Bestrahlung mit 300 kV Röntgenstrahlen und 1 MeV Elektronen	

		Seite
3.1.7.2	Wachstum des unbehandelten HPM im 26 mm-Feld nach Vorbestrahlung mit 33 Gy/ 1 MeV Elektronen	45
3.1.7.3	Wachstum des unbehandelten HPM im vorbestrahlten Tumorbett (33 Gy/ 1 MeV Elektronen) in Abhängigkeit vom Felddurchmesser	47
3.1.7.4	Wachstum des unbehandelten HPM im dorsalen vorbestrahlten Tumorbett (33 Gy/ 1 MeV Elektronen)	51
3.2	Histologie und Histogenese des HPM unter verschiedenen Versuchsbedingungen	52
3.2.1	Histologie des HPM	
3.2.1.1	Histologie des unbehandelten Tumors	
3.2.1.2	Histologie des HPM unter verschiedenen Versuchsbedingungen	54
3.2.1.3	Morphometrische Bestimmung der Gewebsanteile in Tumoren der Wachstumsversuche	55
3.2.2	Histogenese des HPM	59
3.2.2.1	Das Anwachsen der Tumortransplantate	
3.2.2.2	Histogenese des HPM im subklinischen und klinischen Bereich unter verschiedenen Versuchsbedingungen	61
3.2.2.3	Wachstumskurven des nekrotischen und vitalen Tumoranteils sowie des Gesamttumors unter verschiedenen Versuchsbedingungen	63
3.2.2.4	3H-Thymidin-Markierungsindex der untersuchten Tumoren	69
4.	DISKUSSION	72
4.1	Funktionelle Charakterisierung des Tumorbetteffekts	
4.1.1	Erläuterung der Parameter für die Beschreibung und graphische Darstellung des Tumorbetteffekts	
4.1.2	Zeitverlauf des TBE	74
4.1.2.1	Zeitverlauf des TBE für das unbehandelte HPM im vorbestrahlten Tumorbett (30 Gy/ 300 kV)	
4.1.2.2	Zeitverlauf der TBE für transplantierte Rezidive im vorbestrahlten Tumorbett (30 Gy/ 300 kV)	78
4.1.3	Weitere Charakteristika des TBE	79
4.1.3.1	Vergleich des TBE nach Vorbestrahlung mit 30 Gy/ 300 kV Röntgenstrahlen und 33 Gy/ 1 MeV Elektronen	
4.1.3.2	Die Volumenabhängigkeit des Tumorbetteffekts	82

		Seite
4.1.3.3	Die Abhängigkeit des TBE vom Transplantationssitus	85
4.2	Histogenese des HPM unter verschiedenen Versuchsbedingungen	87
4.2.1	Überlegungen zur Erstellung von Volumenmodellen aus Flächenschnitten	
4.2.2	Überlegungen zur Proliferationskinetik des HPM unter verschiedenen Versuchsbedingungen	90
4.3	Pathologie und Pathogenese des Tumorbetteffekts	99
4.3.1	Strahlenschäden der Tumorbettvaskulatur als Ursache des TBE	
4.3.2	Bedeutung der Schädigungsformen des Tumorbetts für den Wachstumsverlauf	102
4.4	Tumorbetteffekt und Rezidivwachstum in situ	106
5.	ZUSAMMENFASSUNG	112
6.	LITERATURVERZEICHNIS	115
	LEBENSLAUF	123

1. EINLEITUNG

Das Wachstum rezidivierender Tumoren nach nicht kurativer Bestrahlung demonstriert eindrucksvoll, daß Tumorwachstum nicht allein als Problem der proliferierenden, vor allem der klonogenen überlebenden Tumorzellen betrachtet werden darf, sondern immer in die Wechselwirkung zwischen Tumorzellen und ernährendem Gewebe sowie dessen Veränderungen unter Therapie eingebettet gesehen werden muß. Die unmittelbarste Wechselwirkung vollzieht sich dabei im Gefäßbindegewebe im und um den Tumor, das allgemein als Tumorbett bezeichnet wird. So erfaßt die lokale Tumorbestrahlung immer auch das Tumorstroma und Teile dieses Tumorbetts.

Während quantitative klinische Daten zu dieser Fragestellung nur wenig bekannt und in ihrer Aussage z.T. widersprüchlich sind (Breur (4)), erlaubt die Verwendung experimenteller Tumorsysteme als Modelle klinischen Tumorwachstums eine exakte Analyse unter reproduzierbaren Versuchsbedingungen. So wurde für die Mehrzahl transplantabler Nagertumoren eine Verlangsamung des Wachstums rezidivierender Tumoren gegenüber ihrem Wachstum vor Therapie gefunden, obwohl die Repopulierung des Tumors aus überlebenden klonogenen Zellen dies nicht von vornherein erwarten läßt (Begg (2, 3), Hilmas (18), Nelson (34, 35), Song (47), Tenforde (56), Thomlinson (57)). Die subkurative Bestrahlung des Harding-Passey-Melanoms (HPM (16)) der NMRI-Maus ergab in Untersuchungen von Schlechtweg (45) eine besonders starke Ausprägung dieser dosisabhängigen Wachstumsverlangsamung. Diese und parallel dazu von Gerte (14) durchgeführte Untersuchungen wiesen auf die ursächliche Bedeutung von Strahlenschäden im Tumorbett für das reduzierte Rezidivwachstum hin.

Innerhalb der umfassenden Literatur über dieses strahlenbiologische Phänomen hat sich dafür der Begriff des Tumorbetteffekts (TBE) eingebürgert. Die erste Beschreibung erfolgte bereits 1914 durch Frankl und Kimball (13), die für ein spontanes Mäusemammacarcinom feststellten, daß "... die harte X-Strahlung nicht bloß, wie dies bekannt ist, die Tumorzelle selbst, sondern auch den Nährboden des Tumors zu beeinflussen vermag, woraus eine bedeutsame Hemmung des Tumorwachstums resultiert.". Russ und Scott (44) erreichten 1940 durch Bestrahlung der Umgebung eines Rattensarkoms unter Abschirmung des Tumors eine ähnliche Wachstumsverlangsamung bzw. Regressionsrate wie nach direkter Tumorbestrahlung. Stenstrom, Vermund et. al. (49, 63, 64) erarbeiteten zwischen 1955 und 1958 eine Reihe von Charakteristika des TBE; anhand der Überlebenszeit von Mäusen, denen ein Mammacarcinom in ein vorbestrahltes Tumorbett transplantiert wurde, konnten sie eine dosisabhängige Zunahme des TBE zwischen 5 und 30 Gy feststellen, während eine weitere Erhöhung der Dosis keine Verlängerung der Überlebenszeit mehr bewirkte. Scott faßte 1958 die wichtigsten Ergebnisse zum TBE zusammen und diskutierte ihn als wesentliche Möglichkeit zur 'indirekten' Beeinflussung des Tumorwachstums durch Bestrahlung. Die gleiche Dosisabhängigkeit wie von Stenstrom und Vermund wurde von Summers et. al. (50, 51) für Mäusetumoren unterschiedlichen histologischen Typs und unterschiedlicher Wachtumsrate beschrieben. während Hewitt und Blake (17) für zwei isogene Mäusesarkome ein Plateau des TBE bereits ab 15 Gy beobachteten. Beide Gruppen untersuchten darüberhinaus die Abhängigkeit des TBE vom Intervall zwischen Tumorbettvorbestrahlung und Transplantation: Summers fand eine Konstanz des Effekts für Intervalle von 1 bis 254 Tage, gemessen an der Überlebenszeit der Tumorträger, Hewitt unter Benutzung der Reduktion der Wachstumsgeschwindigkeit als Kriterium eine Erholung des TBE erst nach einem Jahr und eine er-

neute Ausprägung in gleicher Stärke nach 1 1/2 Jahren. Während die angeführten Untersuchungen mit subkutan transplantierten Tumoren durchgeführt wurden, konnte O'Brien (36) den TBE auch für ein experimentell erzeugtes Colon-Carcinom des Kaninchens nachweisen. Urano und Suit (60) demonstrierten 1971 durch quantitative Injektion von Zellen eines C 3 H - Fibrosarkoms und Mammacarcinoms, daß die Tumorbettvorbestrahlung zwar das Tumorwachstum verlangsamt, nicht jedoch die endgültige Angehrate beeinflussen kann, also nicht zur Zerstörung von Tumorzellen wie bei direkter Bestrahlung führt. Die Abhängigkeit der Wachstumsbeeinflussung von der Strahlenqualität wurde von Rogers (41), der nach Röntgenbestrahlung einen stärkeren Effekt als nach Bestrahlung mit Protonen vorstellt, sowie von Kurpeshev und Konopliannikov (30) erwähnt, die nach Neutronenbestrahlung einen stärkeren TBE als nach reiner γ-Strahlung fanden. Pavicic (37, 38) berichtete, daß nach Tumorbettvorbestrahlung zwar die bekannte Wachstumsreduktion auftritt, aber gleichzeitig eine erhöhte Inzidenz von Lungenmetastasen des transplantierten Fibrosarkoms zu finden ist. In gleicher Weise schrieb Kahn (27) dem TBE eine 'antilokalisierende' Wirkung zu, die er aus einer vermehrten Neigung des Walker-Carcinoms zu lokaler Invasion und Fernmetastasierung ableitet. Neuere funktionelle Untersuchungen von Jirtle und Clifton (6, 23, 24, 25) galten dem Einfluß der Tumorbettvorbestrahlung auf Durchblutung und geweblichen Aufbau des Tumors: Sie sahen bei funktioneller Integrität der vitalen Bezirke eines Mammacarcinoms im vorbestrahlten Tumorbett eine Reduktion dieser vitalen Anteile am Gesamttumor und parallel dazu eine wesentliche Abnahme der Gesamtdurchblutung.

In der vorliegenden Arbeit wird am HPM der NMRI-Maus als einem sensitiven System der Einfluß einer isolierten Tumorbettvorbestrahlung auf das makroskopische Wachstumsverhalten untersucht und ein

differenzierter Zeitverlauf des beobachteten TBE erarbeitet. Die Wachstumsbeeinflussung durch den TBE wird mit der Wachstumsverlangsamung nach Bestrahlung in situ verglichen, die wiederum erheblichen Einfluß auf das strahlenbiologische Experiment der Messung der Wachstumsverzögerung (Regrowth Delay nach Thomlinson (57)) besitzt. Parallel zu den makroskopischen Wachstumsmessungen werden die Auswirkungen des TBE auf die Histogenese, die gewebliche Zusammensetzung und das Proliferationsverhalten des HPM in verschiedenen Wachstumsphasen analysiert. Die allgemeine Bedeutung des TBE bei der Tumorbestrahlung, aber auch seine Stellung als geeignetes System zur Testung der Strahlenwirkung auf das Gefäßbindegewebe sollen hierdurch herausgestellt werden.

2. MATERIAL, METHODEN, VERSUCHSANORDNUNG

2.1 Tiermaterial

Alle Versuche erfolgten an männlichen Albinomäusen vom Stamm NMRI-Neuherberg. Als Nahrung stand den Tieren Standardfutter Altromin (Altrogge-Spezialfutterwerk, Lage) und Wasser unbegrenzt zur Verfügung. Bei Versuchseintritt hatten die Mäuse ein Alter von 8 bis 12 Wochen und ein Gewicht von 35 bis 40 g.

2.2 Tumormaterial

Als transplantables Tumorsystem kam ausschließlich das Harding-Passey-Melanom (HPM) der Maus zur Verwendung. Der am Institut benutzte Tumor wurde 1971 von Dr. Gericke vom Tumorlaboratorium der Farbwerke Hoechst übernommen und seither auf NMRI-Mäusen passagiert. Der Tumor läßt sich in flüssigem Stickstoff nach Belieben konservieren und nach Wiederauftauen weitertransplantieren. In dieser Arbeit wurden 24 Passagen einer laufenden Serie und weitere 14 Passagen einer aufgetauten Linie transplantiert, ohne daß sich Veränderungen im Wachstumsverhalten beobachten ließen.

2.3 Tumortransplantation

2.3.1 Spenderauswahl und Aufarbeitung

2.3.1.1 Unbehandelte Spender

Als Spender wurden unbehandelte Tumoren mit einem Gewicht zwischen 100 und 200 mg ausgewählt, deren Wachstum keine auffälligen

Abweichungen vom Wachstum vergleichbarer Kontrollen zeigte. Sie wurden freipräpariert, vom umgebenden Bindegewebe gesäubert und mit einer Rasierklinge in Gewebswürfel von 1mm Kantenlänge zerteilt. Bis zur Transplantation wurden die Tumorstückchen in physiologischer NaCl-Lösung aufbewahrt.

2.3.1.2 Rezidivierendes HPM als Spender

Rezidive nach lokaler Bestrahlung mit 30 Gy wurden zur Transplantation verwendet, wenn sie sicher in die Phase kontinuierlichen Wiederwachstums eingetreten waren; das Gewicht dieser Tumoren betrug dann zwischen 300 und 500 mg. Auf Grund des hohen Nekrosenanteils in Rezidiven war darauf zu achten, daß nur vital erscheinendes Gewebe, das zumeist am Tumorrand lag, entnommen wurde. Dieses Vorgehen reichte aus, um eine Angehrate von ca. 90 % für retransplantierte Rezidive zu erreichen. Die Vitalität des Tumorbezirks, aus dem die Transplantate entnommen wurden, wurde darüberhinaus für einige Versuchsgruppen an histologischen Präparaten überprüft und bestätigt.

2.3.2 Transplantationsvorgang

2.3.2.1 Transplantation auf unbehandelte Empfänger

Das Fell der Empfängermäuse wurde über dem späteren Tumorsitz an der rechten dorsolateralen Thoraxwand geschoren. Die Transplantation erfolgte unter Narkose mit Diäthyläther. Nach Einlegen der vorbereiteten Tumorwürfel in einen Trokar wurde dieser durch eine Hautinzision an den gewünschten, einer späteren Messung und Bestrahlung leicht zugänglichen Situs geführt und das

Transplantat durch Vorschieben eines Mandrins im subkutanen Gewebe deponiert.

Nur in einem Versuch wurde abweichend ein Situs am Mäuserücken im subkutanen Gewebe genau über der Wirbelsäule und 1,5 cm oberhalb der Schwanzwurzel gewählt.

2.3.2.2 Transplantation in vorbestrahlte Gewebe

Die Hautinzision wurde außerhalb des vorbestrahlten Gebietes gesetzt, um eine zusätzliche Traumatisierung zu vermeiden. Besondere Bedeutung kam der Deponierung des Transplantats im Zentrum des bestrahlten Gewebes zu. Dieses war unmittelbar vor Bestrahlung mit einem Stift markiert worden, wenn die Transplantation noch vor Ausbildung der akuten Hautreaktion auf die Bestrahlung erfolgen sollte, bei späteren Transplantationszeitpunkten aber durch diese Hautreaktion gut definiert. Der nach Abklingen der akuten Strahlenreaktion der Haut zunehmende fibrotische Umbau des subkutanen Gewebes sowie eine sich gelegentlich ausbildende Verkrustung und Vernarbung des bestrahlten Feldes bewirkten häufig eine Verlagerung des zentral deponierten Transplantats zum Feldrand hin bzw. ein Zurückgleiten im Stichkanal, so daß der Tumor später näher an der Feldgrenze lag und nur ein Teil der transplantierten Tumoren in die Wertung genommen werden konnte.

2.4 Messung des Tumorwachstums

Die Wachstumsmessung erfolgte durch perkutanes Angleichen einer Plexiglasschablone mit Bohrlöchern steigenden Durchmessers an die von Tumorhalbkugel und darüberliegender Haut eingenommene Kreisfläche. Die am Institut erstellte Eichkurve, die eine direkte

Korrelation zwischen perkutan ermittelter Kreisfläche und tatsächlichem Tumorgewicht herstellt, wurde übernommen und die eigene Meßgenauigkeit durch Wägung aus den Versuchen ausscheidender Tumoren überprüft. Sie betrug für Kontrolltumoren im Durchschnitt +/- 10% der Kalibrationskurve und war damit für die Mittelwertsbildung von Kollektiven praktisch zu vernachlässigen. Für die Erstellung von Wachstumskurven wurde in der Regel ein Meßbereich zwischen 50 und 500 mg herangezogen.

Bei der Größenmessung in situ bestrahlter oder in vorbestrahlte Felder transplantierter Tumoren bewirkten die Fibrose des subkutanen Gewebes, eine durch Verkrustung und Vernarbung ungleichmäßig vermehrte Hautdicke sowie die starke Abflachung dieser Tumoren häufig eine Überschätzung des Tumorgewichts, wenn nach der angeführten Methode gemessen wurde. Durch sorgfältige Tumorpalpation konnte jedoch auch hier die Tumormasse mit hinreichender Genauigkeit geschätzt werden, wie der regelmäßig erfolgende Vergleich der letzten Messung mit dem Tumorgewicht nach Exzision bestätigte.

2.5 Kriterien für die Wertung transplantierter Tumoren

In den Kontrollgruppen wurden Tumoren gewertet, die keine extremen Abweichungen wie z.B. eingeschobene Regressionsperioden vom Wachstum ihrer Gruppe zeigten.

Für eine Beurteilung des Wachstums in vorbestrahlten Feldern war es Voraussetzung, daß nur Tumoren in die Wertung genommen und als 'im Feld liegend' eingestuft wurden, die bei Transplantation und während der Beobachtungsperiode zentral lagen. Bei einem Tumorgewicht von 350 bis 400 mg entsprach die Ausdehnung der häufig flach wachsenden Tumoren in einigen Fällen bereits der Feldgröße, so daß ein Überschreiten der Feldgrenzen zwischen 400 und

500 mg Tumorgewicht als innerhalb der vorgegebenen Versuchsbedingungen nicht vermeidbar galt und eine Wertung als 'im Feld liegend' zuließ.

2.6 Tumor- und Tumorbettvorbestrahlung

2.6.1 Röntgenbestrahlung

2.6.1.1 Vorüberlegungen

Für alle Tumor- und Tumorbettvorbestrahlungen wurde einheitlich eine Bestrahlung mit einer einmaligen Dosis von 30 Gy durchgeführt. Tumoren kamen zur Bestrahlung, wenn sie ein Gewicht zwischen 80 und 200 mg erreicht hatten.

2.6.1.2 Röntgenanlage und Dosimetrie

Die Bestrahlung erfolgte an einer Röntgenanlage Typ MG 300 der Firma Müller, Hamburg bei einer Röhrenspannung von 300 kV und Röhrenströmen zwischen 6 und 9 mA, einer Dosisleistung von 350 bis 550 R/min am Dosimeter entsprechend. Es wurde ein Filter von 0,6 mm Cu und 1,0 mm Al verwendet. In einem Messingtubus blendeten zwei Ringe ein nutzbares Feld von 26 mm Durchmesser aus, das durch einen scharfen Dosisabfall am Rand und eine durch Filmdosimetrie bestätigte Dosisinhomogenität von weniger als 5 % gekennzeichnet war. Die Dosimetrie während der Bestrahlung wurde mit einem Radocon-Dosimeter durchgeführt, die Dosis dabei durch eine fest im Tubus installierbare Victoreen-Ionisationskammer nach dem Prinzip der Messung des Kompensationsstroms ermittelt. Der vor Bestrahlung am Dosimeter einzustellende Wert

berechnete sich dann aus gewünschter Dosis und Geometriefaktor der Bestrahlungs- und Meßvorrichtung.

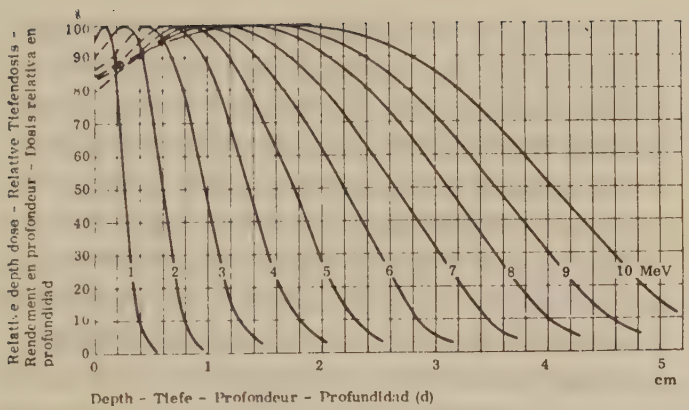
2.6.1.3 Durchführung der Bestrahlung

Die zuvor an der rechten Thoraxwand geschorenen Tiere wurden für die Bestrahlung durch intraperitoneale Injektion von 2 %igem Na-Hexobarbital (Evipan^{R}) narkotisiert, die erforderliche Dosis pro Maus lag zwischen 0,25 und 0,30 ml der Lösung. Nach Fixieren der Tiere mit Tesaband in ventral liegender Position auf einem höhenverstellbaren Laborständer wurden die Tumormitte bzw. ein Punkt, der die Mitte des gewünschten Bestrahlungsfeldes markierte, genau mit der Tubusunterkante und dem Mittelpunkt des vom Tubus ausgeblendeten Feldes zur Deckung gebracht. Auf diese Weise erfaßte der Strahlengang den Tumor und tangential einen Anteil des Mäusethorax unter Ausschluß der Wirbelsäule bzw. bei Tumorbettvorbestrahlung eine vergleichbare Fläche der Mäusehaut.

2.6.2 Elektronenbestrahlung

2.6.2.1 Vorüberlegungen

Um die bei einer Röntgenbestrahlung großer Hautfelder der Maus limitierende Strahlenbelastung tieferer Gewebe - bei thorakalem Bestrahlungsfeld der Lunge - zu umgehen, wurde in einer zweiten Versuchsreihe die Hautbestrahlung mit 1 MeV Elektronen bei senkrecht zur Körperoberfläche einfallendem Strahlengang durchgeführt. Die Kurve der Tiefendosisverteilung läßt die sichere Erfassung des subkutanen Gewebes bei starkem Dosisabfall in tieferen Schichten erwarten (Abb. 1).



d	Depth doses as % of the maximum dose - Tiefendosis in % der Maximaldosis - Rendement en profondeur en % de la dose maximum - Dosis en profundidad en % de la dosis máxima									
	Energy - Energie - Énergie - Energía:									MeV
cm	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0	(96)	(90)	(87)	(83)	(80)	(82)	(83)	(84)	(85)	(86)
0.1	100	(95)	(83)	(87)	(82)	(84)	(84)	(85)	(86)	(87)
0.2	83	(98)	(91)	(88)	(86)	(86)	(86)	(87)	(89)	(90)
0.3	34	100	(96)	(91)	(88)	(89)	(88)	(89)	(91)	(91)
0.4	8	94	(99)	(94)	(92)	(91)	(90)	(92)	(94)	(93)
0.6	(1)	50	97	(99)	(98)	(94)	(93)	(96)	(95)	(94)
0.8	-	10	80	98	100	(99)	(98)	(99)	(96)	(96)
1.0	-	(1)	47	89	98	100	100	100	(98)	(97)
1.2	-	-	17	69	94	98	100	100	(99)	(98)
1.4	-	-	4.5	4.5	82	92	98	100	100	(99)
1.6	-	-	(2)	22	66	84	94	98	100	100
1.8	-	-	-	10	46	74	88	96	99	100
2.0	-	-	-	4	26	62	81	92	96	99
2.5	-	-	-	(2)	4	30	58	76	87	93
3.0	-	-	-	-	(2)	4	32	55	72	80
3.5	-	-	-	-	-	(2)	9	31	51	68
4.0	-	-	-	-	-	-	(3)	10	30	48
5.0	-	-	-	-	-	-	-	-	(4)	12

Abb. 1: Relative Tiefendosen schneller Elektronen (aus Wachsmann, Drexler (66) mit freundlicher Genehmigung des Autors)

2.6.2.2 Bestrahlungsanlage und Dosimetrie

Die Bestrahlungen erfolgten am Van-De-Graaf-Beschleuniger K 3000 der Arbeitsgruppe Beschleuniger der Physikalisch-Technischen Abteilung der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung in Neu-

herberg. Eine elektronisch gesteuerte Ablenkung des erzeugten Elektronenstrahls von 1,5 cm Durchmesser über eine Fläche von 3 x 3 cm (scanning) erlaubte eine homogene Bestrahlung des vorgegebenen Feldes an der Maus. Da sich eine der Dosimetrie bei Röntgenbestrahlung vergleichbare Dosismessung während der Bestrahlung nicht durchführen ließ, mußte diese in einem Vorversuch erfolgen: Mit einer Beistrahl-Ionisationskammer der Physikalisch-Technischen Werkstätten Freiburg, die über eine $Sr^{90}Y^{90}$-Kalibrationskammer der Physikalisch-Technischen Bundesanstalt Braunschweig geeicht worden war, wurde dazu die Dosis an einem Punkt, der der Lage der Epidermisoberfläche des zu bestrahlenden Tiers entsprach, in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdauer bei konstanter Stromstärke von 20 nA bestimmt. Die Einstellung der Dosis während der Bestrahlung erfolgte dann über die Öffnungszeit des den 1 MeV-Elektronenstrahl freigebenden Shutters. Auf Grund der in dieser Arbeit ermittelten Relativen Biologischen Wirksamkeit für die akute Hautreaktion nach einer Bestrahlung von 0,92 gegenüber der Bezugsröntgenstrahlung von 300 kV wurde die Dosis für die Tumorbettvorbestrahlung so festgesetzt, daß eine einheitliche Bestrahlung der Epidermisoberfläche mit 33 Gy gewährleistet war.

Diese Einzeldosis lag dabei an der Untergrenze der technischen Durchführbarkeit, da sich bei einer Dosisleistung von 784 R/sec extrem kurze Öffnungszeiten des druckluftgesteuerten Shutters ergaben. Dies führte mit einer Frequenz von 1 unter 20 Bestrahlungen zu einem Druckabfall am Shutter und zum Versagen seiner Funktion. Die tatsächlich bestrahlte Dosis war in diesen Fällen nicht zu ermitteln, diese Tiere mußten jeweils aus dem Versuch genommen werden.

2.6.2.3 Bestrahlungsvorrichtung und Durchführung

Für die in dieser Art zum ersten Mal durchgeführte Bestrahlung von Hautfeldern an Mäusen wurde folgende Vorrichtung entwickelt:

Am Ende des Strahlaustrittsrohrs wurde eine Plexiglasplatte befestigt, die genau zentral eine Bohrung von 26 mm Durchmesser entsprechend der maximal gewünschten Feldgröße erhielt. Über Halterungsstifte konnte auf diese Platte ein U-förmiger Halter aus Plexiglas mit einer kongruenten seitlichen Bohrung aufgesteckt werden. Die narkotisierte Maus wurde in Rückenlage eingelegt, so daß die zu bestrahlende Thoraxseite vor die Bohrung zu liegen kam. Durch Einbringung eines entsprechenden Plexiglaseinsatzes wurde für einen Teil der Versuche die Größe der Bohrung und damit des Feldes auf einen Durchmesser von 17,5 bzw. 15 mm reduziert.

In einem weiteren Versuch wurden dorsale Hautfelder bestrahlt. Die Vorrichtung mußte in der Weise variiert werden, daß die Maus in Rückenlage auf einer Plexiglasplatte mit entsprechender Bohrung fixiert wurde und sich diese zweite Platte ebenfalls auf die fest am Austrittsrohr angebrachte aufstecken ließ.

2.6.3 Messung der Hautreaktion nach Bestrahlung

Die Ausprägung der akuten Hautreaktion nach Bestrahlung wurde in Anlehnung an Arbeiten von Fowler und Denekamp (8, 12) mit Schweregraden von 0,0 bis 3,0 quantifiziert. In der vorliegenden Arbeit wurde dabei die übliche Abstufung in Schritten von 0,5 Einheiten mit Zwischenwerten von 0,25 Einheiten versehen, um eine exaktere Beschreibung der pathomorphologischen Beobachtungen zu ermöglichen. Zugleich wurde dieses Hautscore-System entsprechend 4 klinisch deutlich unterscheidbarer Phasen der Hautreaktion geglie-

dert: In Phase I beginnt dabei die frühe Hautreaktion mit Rötung und trockener Schuppung, in Phase II schließt sich die feuchte Desquamation an, während in Phase III bereits die Abheilung der feuchten Desquamation unter Ausbildung von Granulationsgewebe und Reepithelialisierung erfolgt. Phase IV erfaßt qualitativ vom üblichen Heilungsverlauf abweichende bzw. sich über längere Zeiträume erstreckende Veränderungen und beginnt deshalb wieder bei einem willkürlichen Score von 2,5 (Tab. 1).

Hautscore	Befund des bestrahlten Feldes
I. Frühphase der akuten Hautreaktion	
0,0	keine sichtbare Veränderung
0,25	verminderter Haarwuchs
0,5	Rötung, leichte Trockenheit
0,75	massive Rötung, Stellen beginnender trockener Schuppung
1,0	beginnende trockene Schuppung im ganzen Feld
1,25	zunehmende trockene Schuppung oder 2 Areale deutlicher trockener Schuppung
1,5	massive trockene Schuppung im ganzen Feld
II. Ausbildung der feuchten Desquamation	
1,75	in 2 Arealen feuchte Desquamation
2,0	feuchte Desquamation in bis zu 25 %
2,25	feuchte Desquamation in 30 bis 40 %
2,5	feuchte Desquamation in 50 bis 60 %
2,75	feuchte Desquamation in 70 bis 80 %
3,0	feuchte Desquamation in mehr als 90 % der Feldfläche

Tab. 1: Score-System zur Quantifizierung der Hautreaktion nach Bestrahlung

Hautscore	Befund des bestrahlten Feldes
III. Abheilung der akuten Hautreaktion unter Bildung von Granulationsgewebe und Reepithelialisierung	
2,75	feuchte Desquamation noch in 70 bis 80 %, restliches Feld von Granulationsgewebe ausgefüllt
2,5	feuchte Desquamation noch in 50 bis 60 %, restliches Feld Granulationsgewebe mit beginnender Reepithelialisierung
2,25	feuchte Desquamation noch in 30 bis 40 %, 30 bis 40 % Granulationsgewebe, Rest reepithelialisiert
2,0	feuchte Desquamation noch in weniger als 25 %, 25 % Granulationsgewebe, Rest reepithelialisiert
1,75	feuchte Desquamation noch in weniger als 10 %, noch bis 20% Granulationsgewebe, Rest epithelialisiert
1,5	desquamierte Flächen vollständig durch Granulationsgewebe verschlossen, Großteil reepithelialisiert
IV. Endgültige und narbige Abheilung der Hautreaktion, persistierende Veränderungen	
2,5	Großteil der Feldfläche verkrustet oder zahlreiche Ulcera oder starke Narbenbildung im ganzen Feld
2,0	Verkrustung oder Vernarbung in ca. 50 % der Feldfläche
1,5	noch 1 größeres Narbenareal, restliches Feld reizlos abgeheilt

Tab. 1 (Fortsetzung): Score-System zur Quantifizierung der Hautreaktion nach Bestrahlung

Hautscore	Befund des bestrahlten Feldes
1,25	kleines persistierendes Ulcus, mehrere kleine Narben
1,0	noch eine deutliche Narbe
0,75	abheilende Narbe an einer Stelle
0,5	reizlos atrophische Haut
0,25	spärliche Wiederbehaarung
0,0	vollständige lange Wiederbehaarung

Tab. 1 (Fortsetzung): Score-System zur Quantifizierung der Hautreaktion nach Bestrahlung

Für die Erstellung von Verlaufskurven der Hautreaktion wurde der Mittelwert der Hautscores einer Versuchsgruppe für einen bestimmten Tag nach Bestrahlung gebildet. Ein mittlerer Scorewert als Funktion der Dosis ergab sich, wenn Mittelwert und Standardabweichung der Hautscores einer Versuchsgruppe vom 16. bis zum 36. Tag nach Bestrahlung berechnet wurden. Dieser Zeitraum erfaßt fast ausschließlich nur die die akute Reaktion beschreibenden Phasen I bis III.

2.7 Histologische Techniken und Methoden

2.7.1 Aufarbeitung entnommener Tumoren für die Histologie

Die Tumoren wurden nach mehrtägiger Fixierung in Formolalkohol in Methylmethacrylat eingebettet (siehe Gerte (14)). Anschließend wurden die ausgehärteten Tumorblöcke mit dem motorisierten Hartschnittmikrotom K der Firma Jung geschnitten, wobei jeweils 3 μ dicke Präparate einer äquatorialen Tumorebene angefertigt wurden.

Die Färbung erfolgte einheitlich mit Mayers Hämalaun und Eosin (siehe Gerte (14)).

2.7.2 Untersuchung der Zellproliferation

2.7.2.1 Markierung der Tumoren mit Tritium-Thymidin

Für die in vivo-Markierung wurde den Tumortragenden Tieren 1 Stunde vor Abtötung 0,01 ml/g einer 3HTdR-Lösung intraperitoneal injiziert. Die Konzentration dieser Lösung betrug 200 μCi/ ml bei einer spezifischen Aktivität von 2 bis 5 Ci/mMol.

2.7.2.2 Autoradiographie

Die Schnittpräparate markierter Tumoren wurden mit Methylglykolacetat entacryliert, in 99 %igem Alkohol gespült und luftgetrocknet. Anschließend erfolgte die Beschichtung mit Kodak NTB 2 Fotoemulsion in der Dunkelkammer nach der 'dipping' Methode: Die gelartige Fotoemulsion wurde bei 42° C im Wasserbad geschmolzen und mit Aqua bidest 1:1 verdünnt. Durch Eintauchen werden die Objektträger mit einer wenige μ dicken Schicht Fotoemulsion überzogen und für 28 Tage in einem lichtundurchlässigen Behälter im Kühlschrank aufbewahrt.

Nach dieser Expositionszeit folgte die Entwicklung und Fixierung (Entwickler D 19b, Kodak Unifix). Die entwickelten Autoradiogramme wurden mit Hämalaun-Eosion gefärbt.

2.7.2.3 Auswertung der Autoradiogramme

Zur Auswertung der Autoradiogramme wurde ein Ölimmersions-

objektiv mit 100facher Vergrößerung und ein Okular mit 10facher Vergrößerung verwendet. Zellkerne, die in der Synthese-Phase Tritium-Thymidin eingebaut haben, bilden sich durch Schwärzung von Silberkörnern in der Fotoemulsion ab. Bei der Zählung dieser markierten Zellen mußte die in jedem Präparat auftretende Hintergrundmarkierung (background) berücksichtigt werden. Als Kriterium für die Markierung galt:

0 bis 2 Silberkörner: Nicht markiert
ab 5 Silberkörner: Sicher markiert
3 bis 4 Silberkörner: Wertung in Abhängigkeit vom background

Einige Präparate konnten auf Grund dieser Definition nicht eindeutig gewertet werden und mußten deshalb aus den Versuchen genommen werden.

2.7.2.4 Bestimmung des Markierungsindex

Der Markierungsindex ist als Anteil markierter Zellen an der Gesamtpopulation in Prozent definiert:

$$\text{Markierungsindex LI} = \frac{\text{Zahl markierter Zellen}}{\text{Gesamtzahl gezählter Zellen}} \times 100$$

Die randomisierende Auswertung erfolgte mit Hilfe eines Strichplattenokulars. Das Gesichtsfeld wurde in regelmäßigen Abständen durch die vitalen Tumoranteile geführt und alle vom Zählstrich geschnittenen Zellkerne als markiert oder unmarkiert registriert. Die Zahl der insgesamt erfaßten Tumorzellen betrug in Abhängigkeit von der Tumorgröße 500 bis 1000 Zellen.

2.7.3 Morphometrische Methoden

2.7.3.1 Bestimmung der Flächenanteile nekrotischen Gewebes im Tumorpräparat

Das HPM läßt in der Hämalaun-Eosin-Färbung eine eindeutige Abgrenzung von vitalem und (prä)nekrotischem Gewebe zu. Zur Quantifizierung der nicht vitalen Anteile im Tumorpräparat diente folgendes Verfahren: Die Schnitte wurden mit einem herkömmlichen Diaprojektor unter konstanten Projektionsbedingungen auf Zeichenkarton projiziert und Umriß des Tumors sowie die Grenzlinien zwischen vitalen und nicht vitalen Tumoranteilen mit einem Bleistift umfahren und gezeichnet. Anschließend wurde der Gesamttumor ausgeschnitten und gewogen, in gleicher Weise wurde mit den nicht-vitalen Arealen verfahren. Das Verhältnis des Papiergewichts aller ausgeschnittenen pränekrotischen und nekrotischen Anteile zum Papiergewicht des Gesamttumorschnitts ergab den Flächenanteil im jeweiligen Tumorpräparat.

2.7.3.2 Serienschnitte

Die Ermittlung von Flächenanteilen der Nekrose im Tumorpräparat gestattet zunächst keine Aussage über die tatsächlichen Volumen- und Gewichtsverhältnisse. Deshalb wurden von repräsentativen Tumoren verschiedener Versuchsgruppen und Größe Serienschnitte in einem Abstand von 150 bis 300 μ angefertigt, histologisch aufgearbeitet, projiziert und gezeichnet. Die Gewichtssumme sämtlicher Nekroseanteile eines Tumors in Relation zur Gewichtssumme aller Tumorquerschnitte ergab dann das Volumenverhältnis der Nekrose im Gesamttumor.

2.8. Versuchsanordnung

2.8.1 Wachstumsbeobachtung

2.8.1.1 Vorüberlegungen zur Bildung der Versuchsgruppen

Faktoren, die das Wachstumsverhalten des rezidivierenden HPM beeinflussen, können sowohl tumor- als auch wirtsbedingt sein. Eine funktionelle Differenzierung kann durch einen Versuchsaufbau erreicht werden, der Transplantationen von unbehandelten Tumoren bzw. von Rezidiven nach Bestrahlung auf unbehandelte Empfänger bzw. auf Empfänger, an denen der Transplantationssitus zu verschiedenen Zeitpunkten vor Transplantation mit 30 Gy/300 kV Röntgen bzw. mit 33 Gy/1 MeV Elektronen vorbestrahlt wurde, vorsieht. Parallel dazu wurde das Wachstumsverhalten des HPM nach Bestrahlung mit 30 Gy/300 kV Röntgenstrahlen untersucht und somit der Vergleich der Einzeleffekte mit dem Effekt der in situ Bestrahlung ermöglicht.

2.8.1.2 Kontrollen

In den einzelnen Versuchsgruppen wurde stets eine gleichzeitige Transplantation auf unbehandelte Empfänger als versuchsinterne Kontrolle mitgeführt. Tabelle 2 gibt einen Überblick über die im Rahmen dieser Arbeit erstellten Kontrollgruppen.

2.8.1.3 Darstellung und Zeitverlauf des Tumorbetteffekts

Bei der experimentellen Abgrenzung des Effekts einer Tumorbettvorbestrahlung auf das Wachstum unbehandelter Tumoren muß berücksichtigt werden, daß das Zeitintervall zwischen Bestrahlung

Spender	Empfänger	Zahl gewerteter Tumoren	Kontrolle zu
unbehandeltes HPM, 24 Passagen in Folge	unbehandeltes thorakales Feld	80	2.8.1.3
unbehandeltes HPM, 14 Passagen in Folge	unbehandeltes thorakales Feld	111	2.8.1.3
rezidivierendes HPM nach 30 Gy Röntgen	ungehandeltes thorakales Feld	61	2.8.1.4
unbehandeltes HPM, 3 Passagen	unbehandeltes dorsales Feld	32	2.8.1.8

Tab. 2: Überblick über Kontrollen der einzelnen Versuchsgruppen

und Transplantation möglicherweise entscheidenden Einfluß auf die Ausprägung des Effekts ausübt. Entsprechend der von Schlechtweg (45) ermittelten Rezidivlatenzzeit - gemessen als Zeit bis zum Erreichen des fünffachen Bestrahlungsgewichts - von 67 Tagen und des für die in dieser Arbeit vorgestellte Gruppe von Rezidiven bei 57 Tagen liegenden entsprechenden Wertes bot sich ein Beginn der Versuche mit Bestrahlungs-Transplantationsintervallen von 46 und 90 Tagen an. Im Anschluß daran untersuchte größere Intervalle dienten der Darstellung einer eventuellen Erholung des vorbestrahlten Tumorbetts, während zunächst geplant war, nur ein kürzeres Intervall als 46 Tage exemplarisch zu bearbeiten. Die Ergebnisse dieses Versuchs legten jedoch auch für diese kurzen

Zeiträume zwischen Bestrahlung und Transplantation eine engere Staffelung nahe, so daß sich der Versuchsaufbau der Tabelle 3 ergab. In den Gruppen '46 d' und '90 d' sind dabei jeweils zwei Einzelversuche zusammengefaßt, die im Abstand von 6 Monaten durchgeführt wurden und die Konstanz der Ergebnisse bestätigten.

Intervall Bestrahlung-Transplantation	3 h	6 d	14 d	18 d	46 d	90 d	184 d	274 d
Zahl gewerteter Tumoren	8	7	8	4	13	8	16	18

Tab. 3: Versuchsaufbau zur Darstellung des Zeitverlaufs des Tumorbetteffekts

2.8.1.4 Wachstum des rezidivierenden HPM im vorbestrahlten Feld

Gleichzeitig mit der Transplantation von HPM-Rezidiven auf unbehandelte Empfänger erfolgte eine Transplantation auf vorbestrahlte Tiere. Eine Ausdehnung dieser Experimente auf alle mit unbehandelten Spendern untersuchte Intervalle erschien auf Grund der Gleichsinnigkeit der Ergebnisse nicht angebracht (Tab. 4).

Intervall Bestrahlung-Transplantation	54 d	93 d	185 d
Zahl gewerteter Tumoren	6	11	14

Tab. 4: Versuchsaufbau zur Darstellung des Tumorbetteffekts retransplantierter Rezidive

2.8.1.5 Tumorbestrahlung in situ

Für den Vergleich der Einzeleffekte mit der Situation der in situ Bestrahlung wurden insgesamt 33 Tumoren lokal mit 30 Gy/ 300 kV Röntgenstrahlen bestrahlt. Das Wachstum aller Tumoren wurde wie beschrieben protokolliert. Geeignete Rezidive mit einer mittleren Latenzzeit dienten als Spendertumoren für die Versuche unter 2.8.1.4.

2.8.1.6 Vorversuch zur Bestimmung der Relativen Biologischen Wirksamkeit von 1 MeV Elektronen an der Haut

Die Dosisabhängigkeit der akuten Hautreaktion nach Bestrahlung von Hautfeldern mit 26 mm Durchmesser wurde für einen in vivo Vergleich der 1 MeV Elektronenstrahlung mit der Bezugsstrahlung von 300 kV Röntgen herangezogen. Tabelle 5 beschreibt den Aufbau dieses Versuchs.

Dosis 300 kV Röntgen	Zahl gewerteter Hautfelder	Dosis 1 MeV Elektronen	Zahl gewerteter Hautfelder
24 Gy	15	24 Gy	10
27 Gy	15	27 Gy	10
30 Gy	15	30 Gy	8
33 Gy	14	33 Gy	9
		36 Gy	9

Tab. 5: Versuchsaufbau zur Ermittlung der Dosisabhängigkeit der akuten Hautreaktion nach Bestrahlung

2.8.1.7 Untersuchungen zur Abhängigkeit des Tumorbetteffekts vom bestrahlten Volumen

Um die Frage zu klären, ob die Wachstumsbeeinflussung durch eine Vorbestrahlung des Empfängers vom Volumen des bestrahlten Gebietes abhängt, erschien die Transplantation unbehandelter Tumoren in vorbestrahlte Felder unterschiedlichen Durchmessers sinnvoll. Während eine tangentiale Röntgenbestrahlung jedoch einen sagittalen Sektor der liegenden Maus erfaßt, sich damit aber ein Dosisabfall innerhalb des Feldes ergibt und außerdem bei Röntgenbestrahlung eine Variation der Feldgröße durch die Tiefendosis limitiert ist, erlaubte der Einsatz einer 1 MeV Elektronenstrahlung mit vertikalem Strahleneinfall eine homogene Bestrahlung eines kreisrunden Feldes exakt definierbarer Größe. Die Durchmesser der bestrahlten Hautfelder betrugen 26 mm, 17,5 mm und 15 mm, die Bestrahlungs-Transplantationsintervalle 14, 47 und 93 Tage; alle Tiere erhielten einheitlich eine Dosis von 33 Gy (Tab. 6).

Intervall Bestrahlung Transplantation	Durchmesser des bestrahlten Feldes	Zahl gewerteter Tumoren
14 d	26 mm	15
	17,5 mm	12
47 d	26 mm	10
	17,5 mm	7
	15 mm	10
93 d	26 mm	9

Tab. 6: Versuchsaufbau zur Untersuchung der Volumenabhängigkeit des Tumorbetteffekts

2.8.1.8 Untersuchungen zur Abhängigkeit des Tumorbetteffekts vom Bestrahlungs- und Transplantationssitus

Die günstige Tiefendosisverteilung der 1 MeV Elektronenstrahlen ließ die Bestrahlung eines dorsalen Feldes mit einem Zentrum genau über der Wirbelsäule und 1,5 cm oberhalb der Schwanzwurzel zu. Es sollte untersucht werden, ob dieser Bestrahlungs- und Transplantationssitus eine exaktere Versuchsdurchführung, insbesondere was den zentralen Sitz des Tumors im Feld betrifft, gewährleisten kann. Die starke Vernarbung nach Abklingen der akuten Hautreaktion nach Bestrahlung sowie die zusätzliche Traumatisierung, die durch ständiges Beißen der Mäuse in dieses Gebiet erfolgte, erschwerten jedoch die Transplantation nach Tumorbettvorbestrahlung erheblich, so daß nur eine Versuchsgruppe mit 7 Tumoren in einem vor 93 Tagen mit 33 Gy bestrahlten Hautfeld von 15 mm Durchmesser gewertet werden konnte.

2.8.2 Histologische, morphometrische und proliferationskinetische Untersuchungen

2.8.2.1 Histologische Auswertung

Von allen Versuchsgruppen mit einem Transplantationsintervall von 46 Tagen oder länger nach Tumorbettbestrahlung mit 30 Gy/300 kV Röntgenstrahlen wurden ebenso wie von den zugehörigen Kontrollen und von in situ bestrahlten Gruppen am Ende der Beobachtungsperiode repräsentative Tumoren entnommen, histologisch aufbereitet, beurteilt und auf ihre Gewebszusammensetzung hin ausgewertet.

2.8.2.2 Versuche zur Histogenese

Ein größerer Versuch diente der Herausarbeitung des zeitlichen Ablaufes der Histogenese vom Zeitpunkt der Transplantation an bis zum Ende der Beobachtungsperiode. Hierzu wurden Tumoren unter 4 verschiedenen Versuchsbedingungen transplantiert:

1) Unbehandeltes HPM im unbehandelten Feld;
2) Rezidivierendes HPM im ungehandelten Feld;
3) Unbehandeltes HPM im 76 Tage und
4) im 175 Tage vor Transplantation mit 30 Gy/ 300 kV Röntgenstrahlen vorbestrahlten Feld.

Zu bestimmten Zeitpunkten nach Transplantation wurden jeweils einige Tumoren entnommen und nach den dargestellten Verfahren aufgearbeitet und analysiert. Bei einem Teil dieser Tumoren erfolgte zusätzlich 1 Stunde vor Entnahme die Pulsmarkierung mit Tritium-Thymidin, so daß sich der Versuchsaufbau der Tabelle 7 ergibt.

Versuchsgruppe	Entnahmeintervall nach Transplantation	Zahl morphometrisch untersuchter Tumoren	Zahl pulsmarkierter Tumoren
unbehandeltes	1 d	2	2
HPM im unbe-	3 d	5	-
handelten Feld	5 d	5	1
	7 d	3	-
	10 d	4	-
	14 d	5	4
	19 d	5	4
	25 d	4	2
	28 d	5	-

Tab. 7: Versuchsaufbau der Histogeneseversuche

Versuchsgruppe	Entnahme-intervall nach Trans-plantation	Zahl morpho-metrisch un-tersuchter Tumoren	Zahl puls-markierter Tumoren
rezidivierendes	1 d	2	-
HPM im unbe-	3 d	3	2
handelten Feld	5 d	3	-
	7 d	3	1
	11 d	3	3
	14 d	3	-
	18 d	2	1
	24 d	6	3
	31 d	5	1
	43 d	4	-
unbehandeltes	3 d	2	1
HPM im vor	5 d	2	2
76 d vorbe-	7 d	3	2
strahlten Feld	10 d	3	2
	14 d	3	3
	19 d	3	2
	25 d	2	-
	35 d	4	-
	66 d	1	1
unbehandeltes	9 d	3	3
HPM im vor	16 d	3	3
175 d vorbe-	19 d	2	-
strahlten Feld	23 d	3	3
	30 d	2	-
	26 d	4	-

Tab. 7 (Fortsetzung): Versuchsaufbau der Histogeneseversuche

3. ERGEBNISSE

3.1 Wachstumsuntersuchungen

3.1.1 Kurvenerstellung

Für jeden beobachteten Tumor wurde in halblogarithmischer Darstellung die individuelle Wachstumskurve gezeichnet. Mittelwertskurven einer Versuchsgruppe werden in der Literatur meist als Zeitverlauf der medianen Tumorgröße dargestellt. In der vorliegenden Arbeit war jedoch das Tumorwachstum sowohl nach in situ Bestrahlung als auch nach Tumorbettvorbestrahlung durch starke Schwankungen in den Latenzzeiten gekennzeichnet. Es bot sich daher eine Darstellung an, die nicht die Tumorgröße als Funktion der Zeit nach Transplantation, sondern die mediane Zeit bis zum Erreichen eines bestimmten Gewichts wiedergibt. Die Streuung wurde entsprechend als Standard Error of the Mean (SEM) in Tagen angegeben. Gleichzeitig konnte aus den individuellen Wachstumskurven die Verdopplungszeit zwischen 50 und 100 mg ($T_{50-100\ mg}$) und zwischen 250 und 500 mg ($T_{250-500\ mg}$) ermittelt und ebenfalls deren Medianwert und SEM berechnet werden. Dieses Verfahren war durch die sowohl den Latenzzeiten als auch den Tumorverdopplungszeiten zugrundeliegende log-Normalverteilung gerechtfertigt, wie sie bereits in früheren Untersuchungen von Schlechtweg (45) demonstriert wurde und hier unter 3.1.6 besprochen wird.

3.1.2 Wachstum im unbehandelten Transplantationssitus

Der Vergleich der Gesamtkurve von 24 unbehandelten Passagen

einer übernommenen mit weiteren 14 Passagen einer aufgetauten Linie des HPM in Abbildung 2 zeigt die Konstanz des Wachstumsverhaltens im unbehandelten thorakalen Transplantationssitus. Dieses Wachstum wird durch eine mit zunehmender Tumorgröße abnehmende Wachstumsrate charakterisiert und kann somit als Wachstum nach einer Gompertz-Funktion beschrieben werden (31).

Ebenfalls in Abbildung 2 dargestellt ist das Wachstumsmuster des unter gleichen Bedingungen transplantierten rezidivierenden HPM nach 30 Gy/ 300 kV Röntgen. Während es sich von dem Verhalten unbehandelter Transplantate hinsichtlich der Wachstumsrate und damit Kurvensteilheit kaum unterscheidet, fällt es durch seine erhebliche Latenz gegenüber dieser Gruppe von durchschnittlich 12 bis 13 Tagen auf.

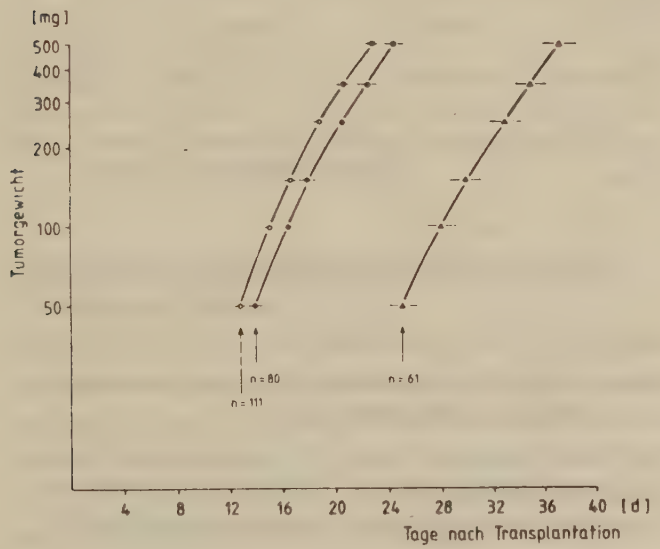


Abb. 2: Wachstum des HPM im unbehandelten thorakalen Situs:
●○ unbehandelte Spender ● übernommene Tumorlinie
○ aufgetaute Tumorlinie
▲ rezidivierendes HPM als Spender

Zu einem späteren Zeitpunkt der Arbeit wurde ein unbehandelter Spender in einen dorsalen medianen Situs transplantiert. Wie Abbildung 3 zeigt, wuchsen diese Tumoren im gesamten Beobachtungsbereich, insbesondere auch im Bereich kleiner Tumormassen deutlich langsamer als Transplantate des gleichen Tumors im thorakalen Situs. Diese Retardierung drückt sich in einer Latenzzeit von knapp 10 Tagen bei 50 mg und von 14 Tagen bei 500 mg aus.

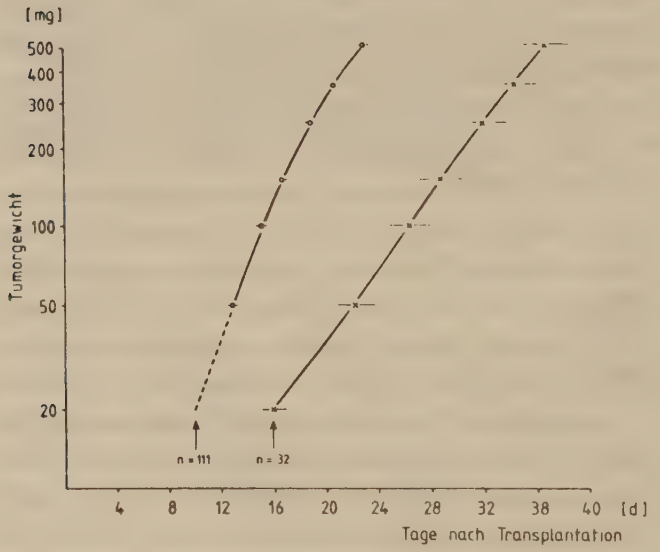


Abb. 3: Wachstum des unbehandelten HPM im unbehandelten thorakalen (O) und dorsalen (X) Situs

Die medianen Verdopplungszeiten aller in einem unbehandelten Transplantationssitus wachsenden Versuchsgruppen sind in Tabelle 8 dargestellt.

Spender	Empfänger	n	$T_{50-100\ mg}$ (d) (-/+ SEM)	$T_{250-500\ mg}$ (d) (-/+ SEM)
unbehandeltes HPM, 24 Passagen	unbehandeltes thorakales Feld	80	2,28 (2,19-2,38)	3,60 (3,44-3,76)
unbehandeltes HPM, 14 Passagen	unbehandeltes thorakales Feld	111	2,11 (2,05-2,18)	3,77 (3,66-3,88)
rezidivierendes HPM nach 30 Gy	unbehandeltes thorakales Feld	61	2,66 (2,52-2,81)	3,89 (3,68-4,11)
unbehandeltes HPM, 3 Passagen	unbehandeltes dorsales Feld	32	3,61 (3,34-3,90)	4,52 (4,29-4,77)

Tab. 8: Wachstumsdaten des HPM nach Transplantation in unbehandelte Transplantationssitus

3.1.3 Wachstum des rezidivierenden HPM nach in situ Bestrahlung

Die in situ mit 30 Gy/ 300 kV Röntgen bestrahlten Tumoren zeigten ein Wachstumsmuster, wie es ausführlich von Schlechtweg beschrieben wurde (45) (Abb. 4): An eine der Bestrahlung folgende Phase verminderter Volumenzunahme des Tumors von einigen Tagen schloß sich eine Regressionsperiode von etwa 8 Tagen Dauer an, ohne daß dabei das Tumorgewicht unter die Bestrahlungsgröße abfiel. Vom 12. Tag an erfolgte wieder eine zunächst zögernde Größenzunahme, die schließlich in ein stetiges Wachstum mit stark reduzierter Wachstumsrate überging. Die mediane Tumorverdopplungszeit zwischen

250 und 500 mg betrug für diese Tumoren 13,52 (12,48 - 14,66) Tage, die mediane Zeit bis zum Erreichen des fünffachen Bestrahlungsgewichts 56,08 (52,95 -59,40) Tage.

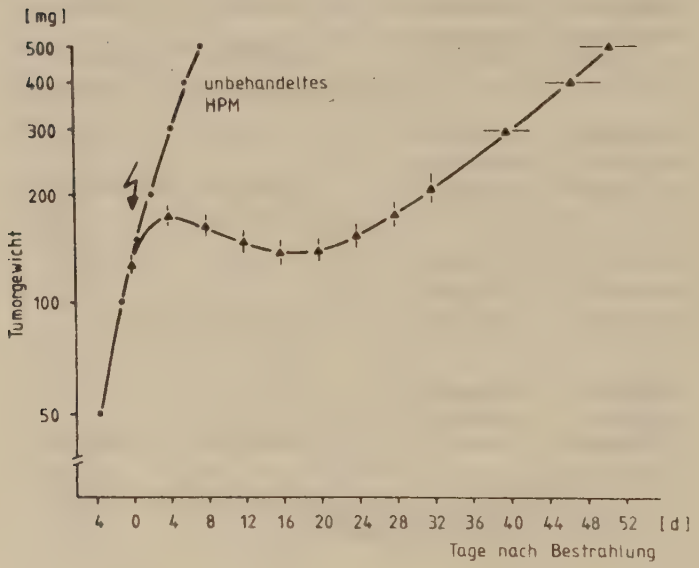


Abb. 4: Wachstum des HPM nach in situ Bestrahlung mit 30 Gy/ 300 kV Röntgen. Bis zum Erreichen einer stetigen Größenzunahme (ca. 32. Tag) wurde die Wachstumskurve durch den geometrischen Mittelwert der Tumorgewichte ($\pm$ SEM) gebildet.

3.1.4 Wachstum des unbehandelten HPM im vorbestrahlten Tumorbett (30 Gy/ 300 kV Röntgen)

Der Effekt einer Vorbestrahlung des Tumorbetts mit 30 Gy/ 300 kV zu verschiedenen Zeitpunkten vor Transplantation ist in Abbildung 5 für die Intervalle 45 bis 274 Tage dargestellt. Die Wachstumskurven

werden wieder in Form der medianen Latenzzeit bis zum Erreichen einer bestimmten Tumorgröße wiedergegeben. Um die Übersichtlichkeit zu erhöhen, wurde aus den zu jeder Versuchsgruppe mitgeführten Kontrollen eine kollektive Kontrollgruppe berechnet. Die einzelnen Latenzzeitkurven wurden jedoch weiterhin auf ihre intraexperimentelle Kontrolle bezogen, indem die Differenz aus Latenzzeit der Versuchsgruppe und Latenzzeit der internen Kontrolle zu den Latenzzeiten der kollektiven Kontrollgruppe addiert wurde. Die Mittelwertsstreuungen der Versuchsgruppe wurden dabei direkt übernommen.

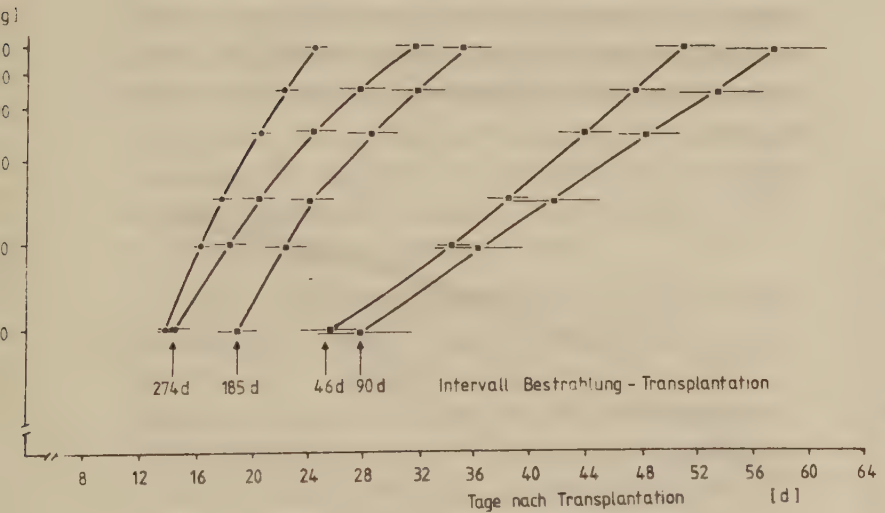


Abb. 5: Wachstum des unbehandelten HPM im unbehandelten (●) und vorbestrahlten Tumorbett (■) für Bestrahlungs-Transplantations-Intervalle von 46 bis 274 Tagen (30 Gy/ 300 kV Röntgen)

Die ausgeprägtesten Veränderungen innerhalb dieser Intervalle wurden bei Transplantation des unbehandelten HPM 45 bzw. 90 Tage nach

Vorbestrahlung des Tumorbetts beobachtet. Diese Tumoren zeigten im gesamten Beobachtungsbereich ein annähernd exponentielles, aber deutlich verlangsamtes Wachstum; die Latenzzeit bis zum Erreichen von 100 mg gegenüber den Kontrollen betrug 17 bzw. 19 Tage. Bei Verlängerung des Intervalls auf 185 und 274 Tage verkürzte sich diese Latenzzeit erheblich, gleichzeitig nahm die Wachstumsrate zu, ohne allerdings die der Kontrollen zu erreichen.

Die Abbildung 6 zeigt die Wachstumsbeeinflussung bei Verwendung kürzerer Intervalle zwischen Bestrahlung und Transplantation. Nach 14 und 18 Tagen transplantierte Gruppen fielen durch eine gegenüber dem 46 Tage-Intervall verkürzte Latenzzeit bis zum Erreichen von 100 mg Tumorgewicht auf; eine stärkere Reduktion der Wachstumsrate oberhalb dieser Tumorgröße jedoch ließ auch diese Gruppen

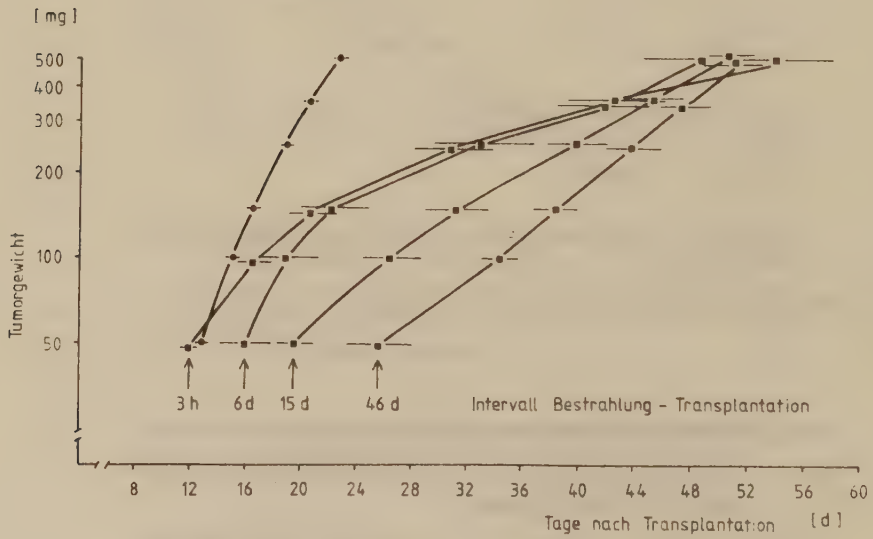


Abb. 6: Wachstum des unbehandelten HPM im unbehandelten (●) und vorbestrahlten Tumorbett (■) für Bestrahlungs-Transplantations-Intervalle von 3 Stunden bis zu 46 Tagen (30 Gy/ 300 kV Röntgen)

das Endgewicht von 500 mg ähnlich spät wie im 46 Tage-Intervall erreichen. Die Übereinstimmung der Wachstumsmuster für diese beiden Transplantationsintervalle gestattete eine gemeinsame Darstellung in einer Kurve; das Intervall wurde entsprechend einer Wichtung auf Grund der Besetzung beider Gruppen als 15 Tage gewertet.

Eine weitere Verkürzung des Bestrahlungs-Transplantations-Intervalls auf 3 Stunden bzw. 6 Tage deckte überraschend eine im 15 Tage-Intervall nur angedeutete allmähliche Ausbildung der Wachstumsbeeinflussung durch die Tumorbettvorbestrahlung auf. Diese Tumoren, die noch vor Ausbildung der akuten Hautreaktion transplantiert wurden, erreichten den Beginn der Beobachtungsperiode bei 50 mg etwa gleichzeitig mit den Kontrollen und ließen damit bis zu diesem Zeitpunkt keine Beeinflussung durch die Vorbestrahlung erkennen. Zwischen 50 und 150 mg unterlagen sie jedoch einer zunehmenden und oberhalb dieser Größe einer dann sehr stark ausgeprägten Wachstumsverlangsamung, wie sie in diesem Ausmaß für kein anderes Intervall zu beobachten war.

In Tabelle 9 sind für die vorgestellten Versuchsgruppen alle Wachstumsparameter aufgelistet, die sich zur Quantifizierung des Tumorbetteffekts eignen. Neben den bereits erwähnten Tumorverdopplungszeiten zwischen 50 und 100 mg und 250 und 500 mg wurde als dritter Parameter die zwischen Versuchsgruppe und zugeordneter Kontrolle gemessene Differenz der Latenzzeiten bis zum Erreichen von 100 mg Tumorgewicht als $\Delta T_{100\ mg}$ eingeführt.

Große Streuungen der eingetragenen Kurvenwerte liegen in der geringen Zahl jeweils wertbarer Tumoren begründet. Nach strengen Kriterien wertbar war ein Tumor nur dann, wenn er weitgehend zentral im Bestrahlungsfeld wuchs. Wurden die Kriterien weniger eng gezogen und auch exzentrische, also näher am Feldrand lie-

Intervall Bestrahlung Transplantation	$\Delta T_{100\ mg}$ (d) (-/+ SEM)	$T_{50-100\ mg}$ (d) (-/+ SEM)	$T_{250-500\ mg}$ (d) (-/+ SEM)
3 h	1,53 (0,33 - 2,84)	4,28 (3,51-5,22)	22,64 (20,40-25,09)
6 d	3,79 (-1,61 - 6,29)	2,47 (2,11-2,89)	8,50 (6,92 - 10,44)
14 d	10,73 (7,95 - 13,84)	5,85 (4,85-7,06)	10,51 (9,25 - 11,88)
18 d	12,81 (10,34-15,51)	7,56 (5,92-9,65)	8,79 (7,54 - 10,25)
46 d	17,94 (16,68-19,26)	5,77 (5,02-6,63)	7,26 (6,51 - 8,09)
90 d	19,73 (16,75-22,98)	7,27 (6,39-9,31)	7,60 (6,44 - 8,99)
184 d	5,96 (4,49 - 7,52)	3,11 (3,50-4,61)	5,78 (5,32 - 6,28)
274 d	2,04 (0,91 - 3,24)	2,81 (2,54-3,10)	6,33 (5,81 - 6,89)

Tab. 9: Wachstumsparameter des unbehandelten HPM im vorbestrahlten Tumorbett (30 Gy/ 300 kV Röntgen)

gende Tumoren eingeschlossen, so ergaben sich stark veränderte Wachstumskurven. Abbildung 7 zeigt dies anhand einer exemplarischen Gegenüberstellung der beiden Untergruppen 'zentral im Feld liegend' und 'marginal' für ein Intervall von 90 Tagen. Die marginalen Tumoren unterlagen zwar in der Anfangsphase ihres Wachstums noch dem Einfluß der Tumorbettvorbestrahlung (siehe Latenzzeit bis 50 mg), mit dem frühen Überschreiten der Feldgrenzen wuchsen sie jedoch wesentlich schneller als die zentral im Feld liegenden Tumoren.

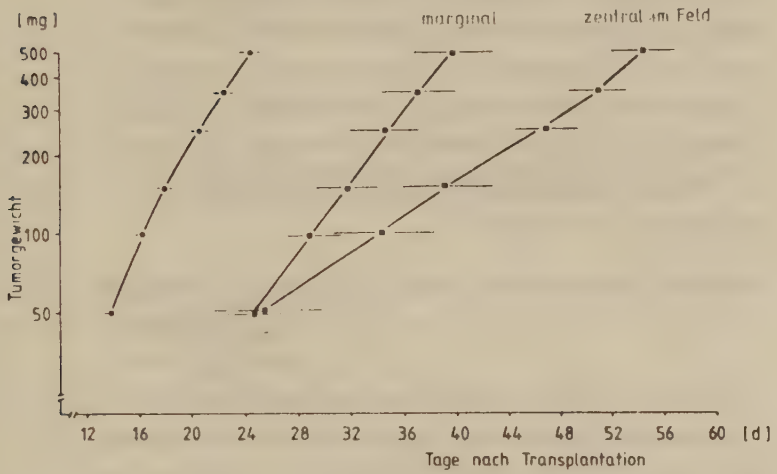


Abb. 7: Vergleich des Wachstums einer 'marginalen' mit dem einer 'zentral im Feld' liegenden Gruppe unbehandelter HPM im vorbestrahlten Tumorbett (Intervall 90 Tage)

3.1.5 Wachstum des rezidivierenden HPM im vorbestrahlten Tumorbett (30 Gy/ 300 kV Röntgen)

Zur Darstellung der Versuchsgruppen in Abbildung 8 wurden die Kurven wieder wie beschrieben auf eine gemeinsame Kontrolle von

Rezidiv-Transplantaten im unbehandelten Tumorbett normiert. Die in vorbestrahlte Felder transplantierten Rezidive unterlagen ähnlich wie die unbehandelten HPM einer Reduktion der Wachstumsrate, die sich über den gesamten Meßbereich erstreckte. Sie erfuhr die stärkste Ausprägung für die 54 und 93 Tage-Intervalle, während sich bei einem Intervall von 185 Tagen bereits eine beginnende Erholung abzeichnete. Da bereits das Rezidivtransplantat im unbehandelten Tumorbett eine Latenzzeit von 12 bis 13 Tagen gegenüber dem unbehandelten HPM aufwies, kann man diese Wachstumskurven als Ergebnis einer Summation dieser Latenzzeit und einer durch das bestrahlte Tumorbett bedingten Wachstumsstörung betrachten. Wie aus der in Tabelle 10 erfolgenden Beschreibung der Wachstumsparameter hervorgeht, ist die $\Delta T_{100\ mg}$ als charakteristischer Parameter jedoch für alle Intervalle nur unwesentlich gegenüber den Versuchen mit unbehandelten HPM verändert.

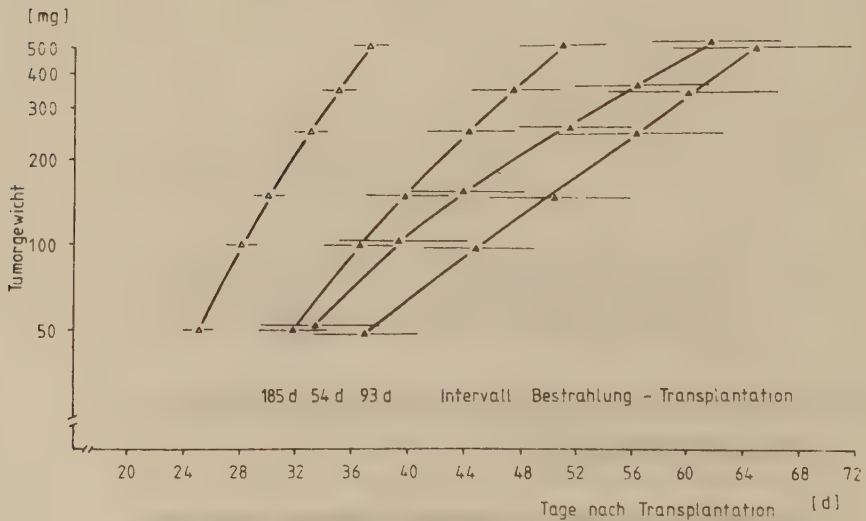


Abb. 8: Wachstum von Rezidivtransplantaten im unbehandelten (△) und vorbestrahlten (▲) Tumorbett für Bestrahlungs-Transplantations-Intervalle von 54 bis 185 Tagen (30 Gy/ 300 kV Röntgen)

Intervall Bestrahlung Transplantation	Δ $T_{100\ mg}$ (d) (-/+ SEM)	$T_{50-100\ mg}$ (d) (-/+ SEM)	$T_{250-500\ mg}$ (d) (-/+ SEM)
54 d	11,20 (66,81-16,15)	4,93 (4,14-5,82)	8,71 (7,74-9,80)
93 d	16,76 (12,85-21,01)	5,89 (4,72-7,34)	8,93 (8,16-9,78)
185 d	8,44 (5,75-11,35)	4,26 (3,78-4,80)	6,21 (5,71-6,76)

Tab. 10: Wachstumsparameter des rezidivierenden HPM im vorbestrahlten Tumorbett (30 Gy/ 300 kV Röntgen)

3.1.6 Kumulative Häufigkeit der Tumorverdopplungszeiten vorgestellter Versuchsgruppen

Im Wahrscheinlichkeitsnetz der Abbildung 9 ist die kumulative Häufigkeit der aus den Einzelkurven ermittelten Verdopplungszeiten zwischen 250 und 500 mg Tumorgewicht für einige der bisher besprochenen Versuchsanordnungen aufgetragen. Während unbehandeltes und rezidivierendes HPM im unbehandelten Transplantationssitus durch eine nahezu identische Verteilung mit einer mittleren Verdopplungszeit von 4 Tagen gekennzeichnet sind, verschieben sich die Verteilungen der im vorbestrahlten Tumorbett wachsenden Gruppen in Anhängigkeit vom Intervall zwischen Bestrahlung und Transplantation zu größeren Verdopplungszeiten hin. Die Verdopplungszeiten des nach Bestrahlung in situ rezidivierenden HPM wurden dabei vom 6 Tage-Intervall erreicht bzw. vom 3 Stunden-Intervall überschritten. Unabhängig von den Versuchsbedingungen

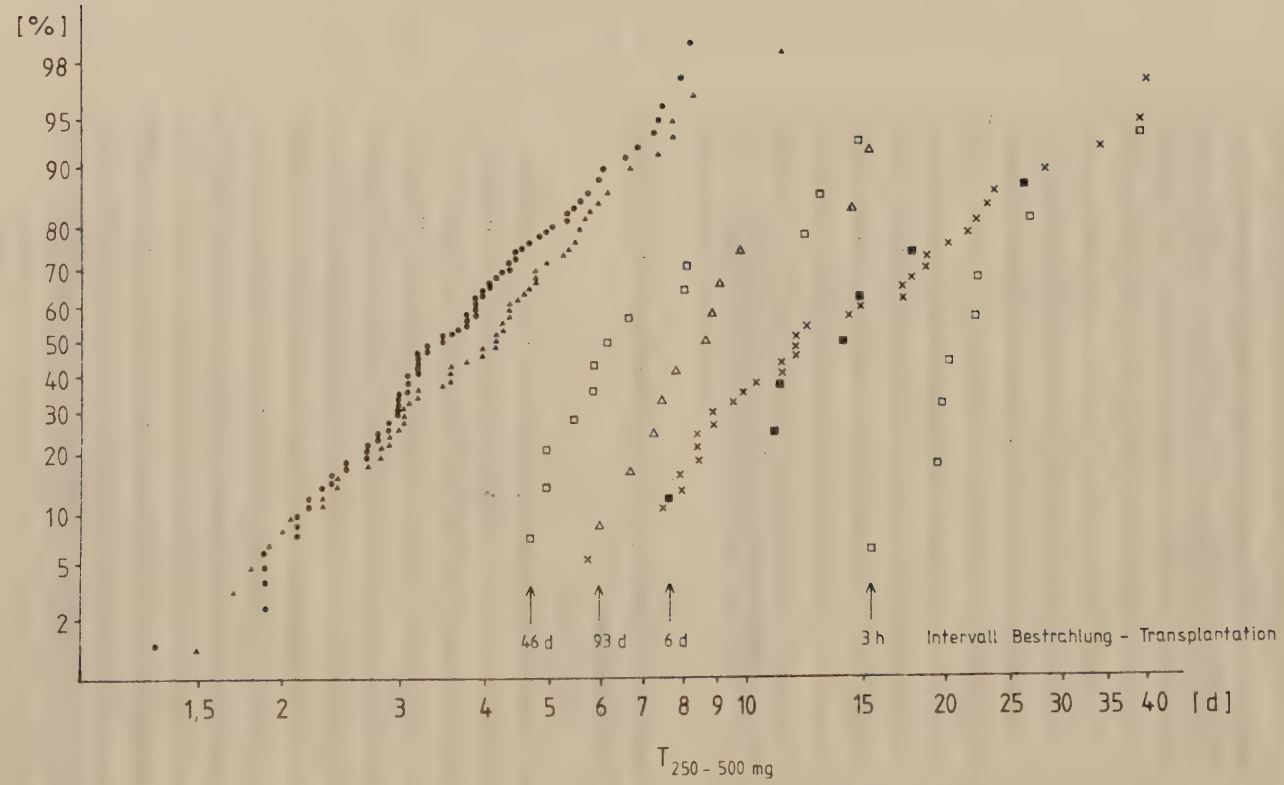


Abb. 9: Kumulative Häufigkeit der Verdopplungszeit der Tumortransplantate von 250 auf 500 mg ($T_{250-500mg}$) unter verschiedenen Versuchsbedingungen:
● ▲unbehandeltes Tumorbett / Spender: ● unbehandeltes HPM ▲ rezidivierendes HPM nach 30 Gy/ 300 kV
△□■vorbestrahltes Tumorbett / Spender: ■ □unbehandeltes HPM △ rezidivierendes HPM nach 30 Gy/ 300 kV
× Lokalrezidiv nach 30 Gy/ 300 kV

unterliegen alle Versuchsgruppen einer log-Normalverteilung; dieses Verhalten lieferte wie beschrieben die Grundlage für die Verfahren zur Mittelwertsbildung.

3.1.7 Tumorbettbestrahlung mit 1 MeV Elektronen

3.1.7.1 Vergleich der akuten Hautreaktion nach Bestrahlung mit 300 kV Röntgenstrahlen und mit 1 MeV Elektronen

Für den Wirkungsvergleich der beiden Strahlenarten sind zunächst die unterschiedlichen geometrischen Bedingungen der Röntgen- und Elektronenbestrahlung zu berücksichtigen. Die Elektronenbestrahlung erlaubte bei senkrechtem Strahleneinfall eine homogene Dosisverteilung im gesamten Feld von 26 mm Durchmesser. Die Bestrahlungsvorrichtung der Röntgenanlage bedingte jedoch eine tangentiale Bestrahlung mit etwa der Hälfte des durch den Tubus ausgeblendeten Bündels. Das letztlich auch hier zu beobachtende kreisförmige Feld von 26 mm Durchmesser setzte sich deshalb aus einer direkt bestrahlten, dorsalen Halbkreisfläche und einem entsprechenden ventralen Anteil zusammen, wobei erstere mit der Eintrittsdosis, letzterer aber mit der etwas niedrigeren Austrittsdosis belastet wurde. Die strahlenbedingten Hautveränderungen waren dadurch bei allen Dosen in der dorsalen Feldhälfte stärker ausgeprägt. Für den quantitativen Vergleich der Hautschädigung wurde deshalb bei Röntgenbestrahlung die dorsale, direkt bestrahlte Feldhälfte als 100 % der zu beurteilenden Fläche angesetzt. Nach Elektronenbestrahlung lieferte hingegen die Beurteilung nur einer Feldhälfte wegen der homogenen Schädigung die gleichen Scorewerte wie die des Gesamtfelds.

Den zeitlichen Verlauf der Schädigung für beide Bestrahlungsbedingungen zeigen die Abbildungen 10 und 11: Sowohl nach Röntgen

als auch nach Elektronenbestrahlung der Mäusehaut bildete sich nach höheren Dosen eine typische akute Hautreaktion aus, die über ein Vorstadium der Rötung und trockenen Schuppung zur feuchten Desquamation der bestrahlten Fläche führte. Das Maximum dieser Reaktion war nach 21 bis 24 Tagen erreicht, die Veränderungen wurden anschließend rasch von Granulationsgewebe und nachfolgend von Epithel überzogen. Während jeweils ein Teil der bestrahlten Felder reizlos abheilte und schließlich wiederbehaart war, blieben in anderen Fällen lange persistierende Krusten, einzelne Ulcera und Narbenstränge zurück, die eine nur sehr langsame Tendenz zur Abheilung zeigten. Der Schwellenbereich der feuchten Desquamation, einem durchschnittlichen Schweregrad von 1,5 entsprechend,

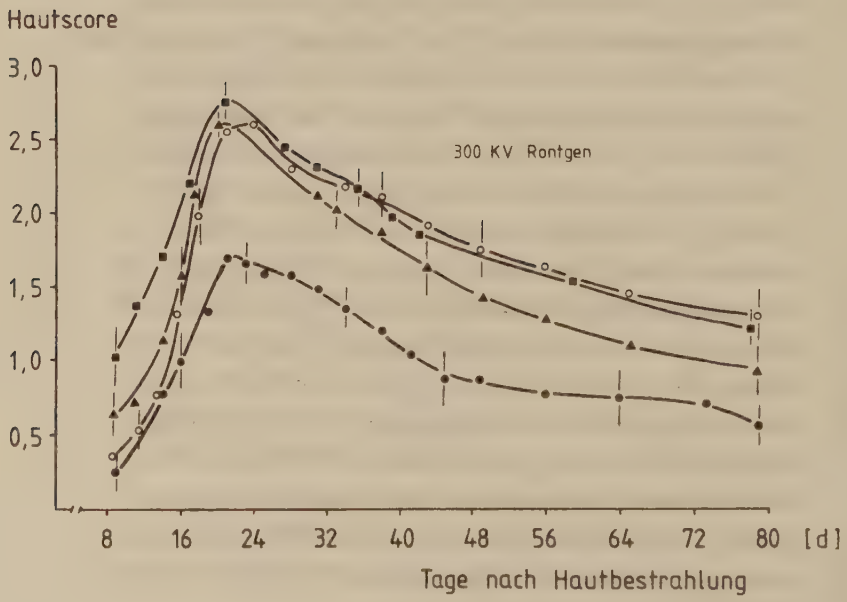


Abb. 10: Zeitverlauf der Hautschädigung nach Bestrahlung mit 300 kV Röntgenstrahlen (± SEM);
Dosis: ● 24 Gy/ ○ 27 Gy/ ▲ 30 Gy/ ■ 33 Gy.

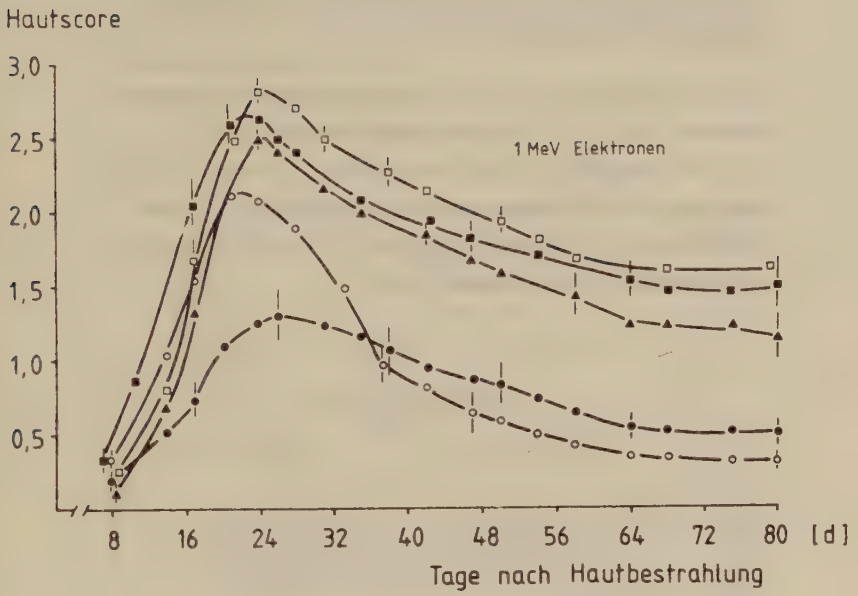


Abb. 11: Zeitverlauf der Hautschädigung nach Bestrahlung mit 1 MeV Elektronenstrahlen (± SEM);
Dosis: ● 24 Gy/ ○ 27 Gy/ ▲ 30 Gy/ ■ 33 Gy/ □ 36 Gy.

wurde nach Röntgenbestrahlung mit 24 Gy gerade erreicht, während er sich im elektronenbestrahlten Feld deutlich zwischen 24 und 27 Gy markierte. Die Verlaufskurven nach Röntgenbestrahlung deuteten zudem eine dosisabhängige Verschiebung der Ausbildung der Hautreaktion zu früheren Zeitpunkten an, während die Maxima nach 27, 30 und 33 Gy zeitlich sowie in ihrer absoluten Höhe fast zusammenfielen. Im Gegensatz dazu verlief der Anstieg der Hautreaktion im elektronenbestrahlten Feld für alle Dosen nahezu gleich. Die Dosisabhängigkeit der Maxima und der nachfolgenden Phase der Reepithelialisierung prägte sich hier jedoch stärker aus. Ebenso ließ sich in diesen Feldern eine deutlichere Dosisgrenze für chronische

Veränderungen (entsprechend Phase IV in 2.1.5) beobachten, die zwischen 27 und 30 Gy lag.

Aus den Verlaufskurven wurde der dosisabhängige Schädigungsgrad bestimmt, indem die Scorewerte zwischen dem 16. und 36. Tag nach Hautbestrahlung gemittelt wurden (Tab. 12). Dieser Bereich beschreibt die Ausbildung der feuchten Desquamation sowie die erste Abheilungsphase durch Granulation und damit die Phase der stärksten Ausprägung der akuten Hautreaktion.

Dosis	Mittlerer Hautscore (± SEM)	
	300 kV Röntgen	1 MeV Elektronen
24 Gy	1,45 ± 0,09	1,15 ± 0,04
27 Gy	2,15 ± 0,14	1,74 ± 0,07
30 Gy	2,22 ± 0,13	2,08 ± 0,08
33 Gy	2,42 ± 0,10	2,31 ± 0,05
36 Gy	-	2,42 ± 0,08

Tab. 12: Vergleich der mittleren Schweregrade der Hautreaktion in Abhängigkeit von der Dosis für 300 kV Röntgen- und 1 MeV-Elektronenstrahlen

Mit den gemittelten Werten lassen sich die in Abbildung 12 dargestellten Dosiswirkungsbeziehungen der akuten Hautreaktion für 1 MeV Elektronen und 300 kV Röntgen erstellen. Durch Dosisvergleich bei verschiedenen Schädigungsgraden kann hieraus die Relative Biologische Wirksamkeit für 1 MeV Elektronen abgelesen werden. Sie beträgt für eine Hautreaktion von 1,5 0,93, für eine Reaktion von 2,0 0,91, für die Reaktion von 2,4 0,93 und als Mittelwert 0,92. Auf Grund dieser Ergebnisse wurde auch für die Tumorbettbestrahlung mit 1 MeV Elektronen eine einheitliche Dosis von 33 Gy gewählt. Der Dosisabfall durch die Hautschichten

zum subkutanen Bindegewebe kann dabei infolge des, wenn auch geringen, Aufbaueffekts von 1 MeV Elektronen (siehe 2.6.2.1) vernachlässigt werden.

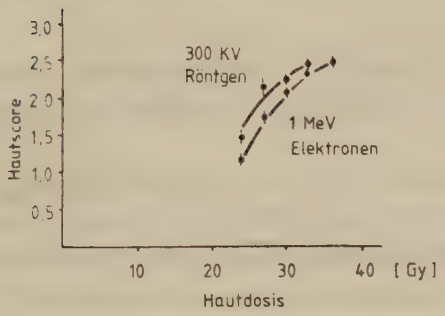


Abb. 12: Dosis-Wirkungsbeziehung der akuten Hautreaktion für 300 kV Röntgen- und 1 MeV Elektronenstrahlen

3.1.7.2 Wachstum des unbehandelten HPM im 26 mm-Feld nach Vorbestrahlung mit 33 Gy/ 1MeV Elektronen

Nach Transplantation eines unbehandelten HPM in das mit 1 MeV Elektronen vorbestrahlte Tumorbett von 26 mm Durchmesser zeigte der Tumor ein den Ergebnissen der Versuche mit Röntgenvorbestrahlung vergleichbares Wachstumsverhalten (Abb. 13). Für das 15 und das 47 Tage-Intervall ließ sich eine gleichmäßige Reduktion der Wachstumsrate feststellen, während sich für das 93 Tage-Intervall eine mit der Tumorgröße noch gering zunehmende Verlangsamung ergab. Die auch bei der Darstellung der Wachstumsparameter in Tabelle 13 auffallend kurze Latenzzeit dieses Intervalls erklärt sich zum Teil aus der Tatsache, daß die intraexperimentelle Kontrollgruppe dieses Versuchs durch eine gegenüber

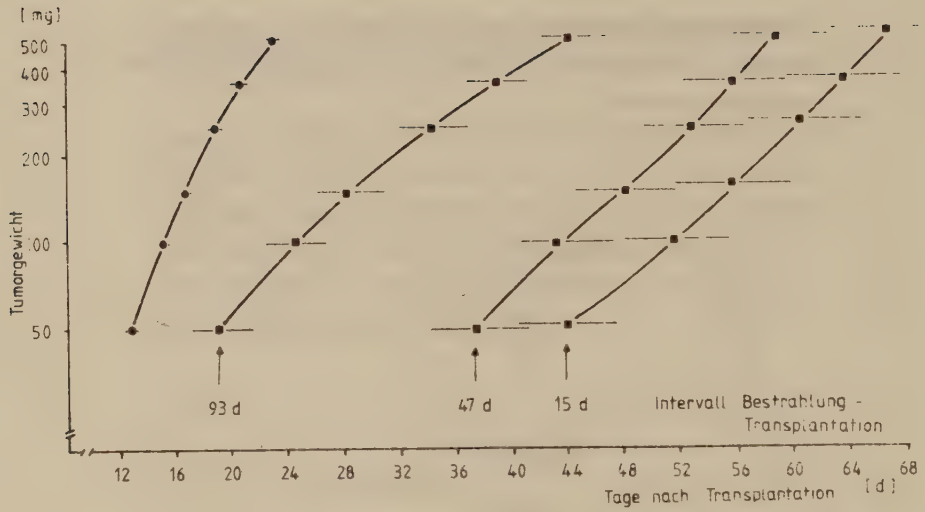


Abb. 13: Wachstum des unbehandelten HPM im unbehandelten (●) und vorbestrahlten (■) Tumorbett für Bestrahlungs-Transplantations-Intervalle von 15 bis 93 Tagen (33 Gy/ 1 MeV Elektronen - Felddurchmesser 26 mm)

Intervall Bestrahlung Transplantation	$\Delta T_{100\ mg}$ (d) (-/+ SEM)	$T_{50-100\ mg}$ (d) (-/+ SEM)	$T_{250-500mg}$ (d) (-/+ SEM)
15 d	36,71 (32,97-40,75)	7,61 (7,06-8,20)	6,25 (5,87 -6,67)
47 d	28,63 (25,11-32,47)	5,53 (5,05-6,07)	5,83 (5,32 -6,38)
93 d	9,46 (7,22-11,88)	5,47 (5,19-5,75)	8,94 (7,94-10,07)

Tab. 13: Wachstumsparameter des unbehandelten HPM im 26 mm Feld nach Vorbestrahlung mit 33 Gy/ 1 MeV Elektronen

den übrigen Kontrollen bereits um 9 Tage verlängerte Latenzzeit gekennzeichnet war. Das angeführte Verfahren der Normierung auf eine gemeinsame Kontrollgruppe bedingt deshalb eine Verschiebung der Wachstumskurve des 93 Tage-Intervalls um diesen Zeitraum auf die Kontrollkurve zu.

3.1.7.3 Wachstum des unbehandelten HPM im vorbestrahlten Tumorbett (33 Gy/ 1 MeV Elektronen) in Abhängigkeit vom Felddurchmesser

Erste Untersuchungen zur Frage der Volumenabhängigkeit des Tumorbetteffekts wurden bei einem Intervall von 47 Tagen durchgeführt (Abb. 14, Tab. 14). In Bestrahlungsfelder von 26 und 17,5 mm Durchmesser transplantierte unbehandelte HPM unterschieden sich kaum in ihrer Wachstumsgeschwindigkeit; für das 15 mm Feld ergab sich eine insgesamt steilere Wachstumskurve. Dies könnte ebenso wie die für beide kleinere Felder geringere Latenzzeit als Hinweis auf eine Volumenabhängigkeit gewertet werden.

Ein zweiter Versuch betrachtete den Einfluß des bestrahlten Volumens auf die Wachstumsreduktion im bestrahlten Tumorbett von 26 und 17,5 mm Durchmesser zu einem transplantationstechnisch günstigeren Intervall von 15 Tagen. Die zu diesem Zeitpunkt gerade erst beginnende Hautreaktion gestattete eine exaktere Deponierung des Transplantats im Feldzentrum; im weiteren Verlauf wurde die Entfernung der Tumormitte vom Feldrand über den gesamten Meßbereich protokolliert.

Dadurch wurde über einen Vergleich der Gesamtgruppe aller als im Feld liegend gewerteter Tumoren hinaus auch eine Klassierung nach dem mittleren Tumorabstand vom Feldrand innerhalb der jeweiligen Gruppe möglich. Für jede Feldgröße wurden 3 Klassen

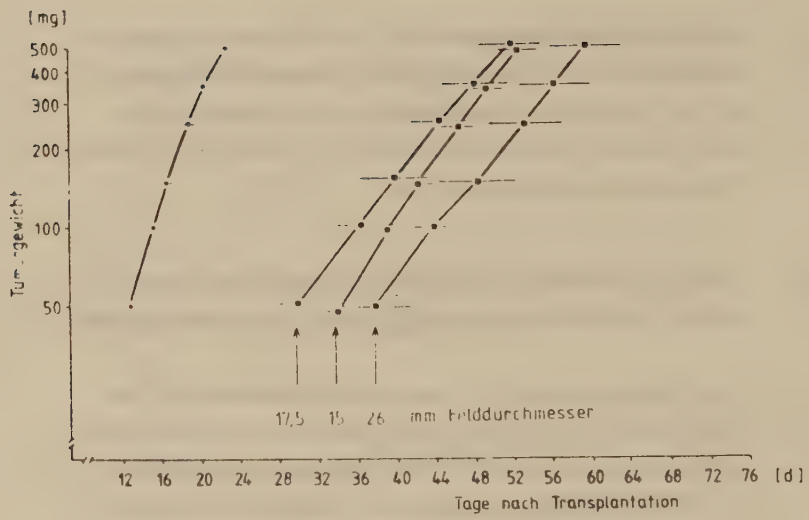


Abb. 14: Wachstum des unbehandelten HPM im vorbestrahlten (■) Tumorbett (33 Gy/ 1MeV Elektronen - Intervall 47 Tage) in Abhängigkeit vom Felddurchmesser / (●) Kontrolle

Felddurchmesser (mm)	ΔT_{100} mg (d) (-/+ SEM)	T_{50-100} mg (d) (-/+ SEM)	$T_{250-500}$ mg (d) (-/+ SEM)
26	28,63 (25,11-32,47)	5,53 (5,05-6,07)	5,83 (5,32-6,38)
17,5	21,01 (17,73-24,62)	6,10 (5,71-6,51)	6,77 (6,39-7,18)
15	23,79 (22,30-25,34)	4,11 (3,57-4,74)	4,80 (4,23-5,45)

Tab. 14: Wachstumsparameter des unbehandelten HPM im vorbestrahlten Tumorbett (33 Gy/ 1 MeV Elektronen - Intervall 47 Tage): Abhängigkeit vom Durchmesser des Bestrahlungsfeldes

gebildet mit einem mittleren Abstand der Tumormitte zum Feldrand von 9,7 mm, 7,2 mm und 4,7 mm für das 26 mm Feld und 6,4 mm, 4,6 mm und 2,9 mm für das 17,5 mm Feld. Da die entsprechenden Wachstumskurven nur geringe Unterschiede zeigten, werden in Abbildung 15 nur die Gesamtgruppen beider Feldgrößen dargestellt, die Wachstumsparameter in Tabelle 15 jedoch sowohl für die Gesamtgruppe als auch für alle Klassen getrennt angeführt.

Kurven und Wachstumswerte deuten für das kleiner Bestrahlungsvolumen zwar eine kürzere Latenzzeit an, lassen aber gleichzeitig eine stärkere Reduktion der Wachstumsgeschwindigkeit dieser Gruppen erkennen, wobei diese Veränderungen wegen der großen Streubereiche nicht signifikant sind. Ebensowenig läßt die Klassenbildung innerhalb der Gruppen Gesetzmäßigkeiten folgern; die kleinere $T_{250-500\ mg}$ in den Klassen mit geringstem Abstand (4,7 bzw. 2,9 mm) ist hier durch das teilweise Erreichen der Feldgrenze durch den Tumor in diesem Größenbereich erklärbar.

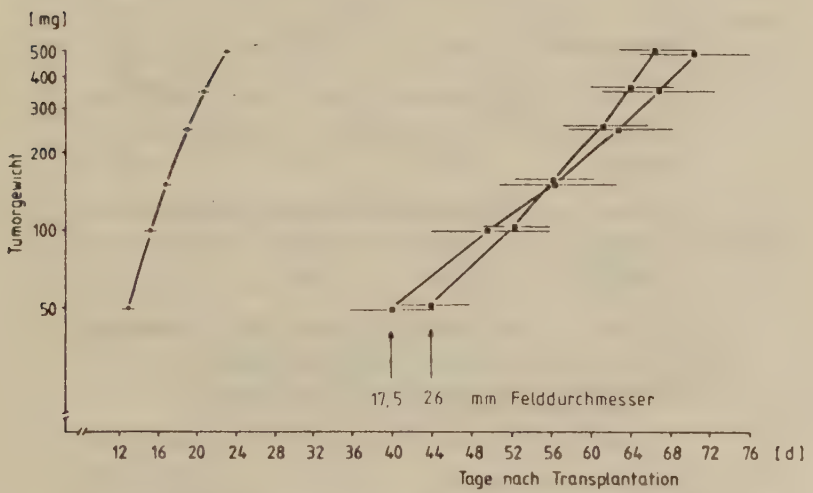


Abb. 15: Wachstum des unbehandelten HPM im vorbestrahlten (■) Tumorbett (33 Gy/ 1 MeV Elektronen - Intervall 15 Tage) in Abhängigkeit vom Felddurchmesser / (●) Kontrolle

Feld-durch-messer (mm)	Mittlerer Abstand Tumormitte-Feldrand (mm)	$\Delta T_{100\ mg}$ (d) (-/+ SEM)	$T_{50-100\ mg}$ (d) (-/+ SEM)	$T_{250-500\ mg}$ (d) (-/+ SEM)
26	Gesamtkurve 6,9 n=15	36,71 (36,97-40,75)	7,61 (7,06 - 8,20)	6,25 (5,87-6,67)
	Klasse I 9,7 n=5	31,40 (25,98-37,56)	6,93 (5,86 - 8,20)	6,59 (5,56-7,82)
	Klasse II 7,2 n=5	48,00 (40,67-56,32)	8,07 (7,18 - 9,07)	6,42 (5,81-7,09)
	Klasse III 4,7 n=5	32,33 (24,23-41,02)	7,87 (7,00 - 8,85)	5,78 (5,56-6,01)
17,5	Gesamtkurve 4,5 n=12	34,81 (29,32-41,02)	8,99 (8,17 - 9,90)	7,03 (6,27-7,88)
	Klasse I 6,4 n=4	18,73 (13,69-24,71)	9,62 (7,68-12,06)	8,65 (7,93-9,44)
	Klasse II 4,6 n=5	53,95 (49,85-58,31)	8,96 (8,03-10,00)	6,89 (5,39-8,80)
	Klasse III 2,9 n=3	33,97 (24,55-45,69)	8,27 (6,55-10,45)	5,49 (4,92-6,14)

Tab. 15: Wachstumsparameter des unbehandelten HPM im vorbestrahlten Tumorbett (33 Gy/ 1 MeV Elektronen - Intervall 15 Tage) in Abhängigkeit vom Felddurchmesser: Gesamtgruppe und Klassierung nach mittlerem Abstand Tumormitte-Feldrand

3.1.7.4 Wachstum des unbehandelten HPM im dorsalen vorbestrahlten Tumorbett (33Gy/ 1 MeV Elektronen)

Wie unter 3.1.2 dargestellt wurde, ergab sich bei Transplantation in einen dorsalen unbehandelten Situs ein gegenüber dem thorakalen Situs deutlich verlangsamtes Tumorwachstum. Der Einfluß einer Vorbestrahlung des dorsalen Tumorbetts mit einem Feld von 15 mm Durchmesser auf das Wachstum nach 93 Tagen transplantierter HPM drückt sich dabei nicht in einer zusätzlichen Wachstumsreduktion aus, sondern blieb auf eine allerdings beträchtliche Zunahme der Latenzzeit gegenüber den dorsalen Kontrollen beschränkt (Abb. 16, Tab. 16).

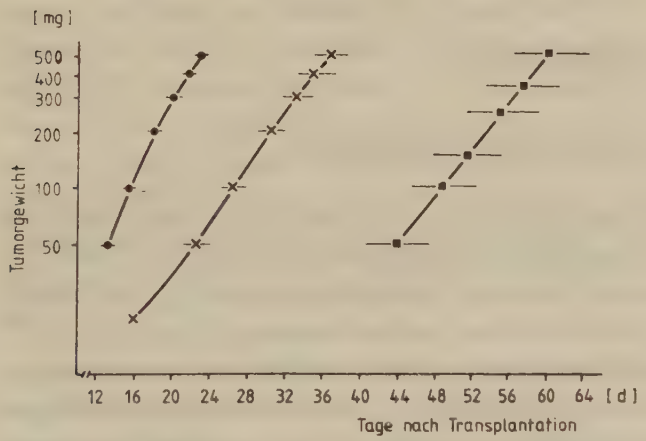


Abb. 16: Wachstum des unbehandelten HPM im unbehandelten thorakalen (●) und dorsalen (✕) Situs sowie im vorbestrahlten Tumorbett von 15 mm Durchmesser (■) (33 Gy/ 1 MeV Elektronen - Intervall 93 Tage)

Felddurchmesser (mm)	$\triangle T_{100}$ mg (d) (-/+ SEM)	T_{50-100} mg (d) (-/+ SEM)	$T_{250-500}$ mg (d) (-/+ SEM)
15	22,47 (18,96-26,26)	4,84 (4,54-5,17)	5,48 (4,88-6,16)

Tab. 16: Wachstumsparameter des unbehandelten HPM im vorbestrahlten dorsalen Tumorbett (33 Gy/ 1 MeV Elektronen - Intervall 93 Tage)

3.2 Histologie und Histogenese des HPM unter verschiedenen Versuchsbedingungen

3.2.1 Histologie des HPM

3.2.1.1 Histologie des unbehandelten Tumors

Die eigentliche Tumorzellpopulation des HPM besteht aus spindelförmigen Zellen mit zart eosinophilem Zytoplasma, in dem sich Melanin in Form sehr feiner Granula verteilt. Die großen Kerne dieser Zellen weisen mehrere Nukleolen auf. Als zweite, im vitalen Tumorbereich seltenere Zellart kommen Rundzellen mit massiver, grobgranulärer Melaninspeicherung vor, die auf Grund ihrer Größe und der Speicherform als Melanophagen identifiziert werden können. Diese beiden Zelltypen bilden im Präparat meist große Flächen zusammenhängenden vitalen Gewebes, das mit zunehmender Größe dieser Flächen und des Gesamttumors vermehrt pyknotische oder nekrotische Inseln enthält. In einem Beobachtungsbereich, der die Tumorgröße von 500 mg überschreitet, weisen die Tumoren zudem größere, teilweise homogene nekrotische Areale auf. Die insgesamt schmale, weniger als 100 μ

dicke Übergangszone von vitalem zu nekrotischem Gewebe setzt sich aus einem Saum von Zellen mit Kernpyknose, einer darauffolgenden Schicht mit Karyorrhexis sowie einer breiten Zone von Melanophagen zusammen, an die schließlich die amorphe, Melaningranula enthaltende Koagulationsnekrose anschließt. Vitale und nicht-vitale Areale sind durch diese bandförmige Anordnung von Stadien zunehmenden Zelluntergangs im HPM sehr deutlich demarkiert.

Das HPM ist durch einen sehr geringen Anteil von Stromaelementen charakterisiert. Die Gefäßversorgung läßt neben einer größeren Anzahl meist im Tumorrandbereich liegender Sinusoide eine disseminierte Verteilung kleinster Kapillaren im vitalen Gewebe erkennen. Beide Strukturen, Sinusoide und Kapillaren, sind nur gelegentlich mit Endothelien ausgekleidet und durch eine Basalmembran gegen die Tumorzellen abgegrenzt, meist aber reichen diese selbst bis an das Gefäßlumen oder sogar in dieses hinein. Den Tumorrandbereich durchziehen sehr vereinzelt kleine arterielle Gefäße, typische venöse Strukturen lassen sich nicht identifizieren. Bindegewebsanteile fehlen innerhalb des Tumors vollständig, der Tumor als Ganzes ist jedoch meist von einer schmalen Tumorkapsel umgeben.

Als besondere strukturelle Einheit finden sich im HPM vor allem in den Übergangsregionen vitaler Areale in die Nekrose, aber auch disseminiert in dieser, die von Tannock (53) beschriebenen Tumorstränge (cords), bei denen es sich um eine manschettenförmige Anordnung vitaler Zellen in meist 5 bis 8 Lagen um ein zentral liegendes Gefäß handelt. Mit zunehmendem Abstand von diesem versorgenden Gefäß nekrotisieren die Tumorzellen in der für die Übergangszone beschriebenen Schichtenfolge, um schließlich in die amorphe Nekrose überzugehen. Tannock konnte dieses Verhalten mit der

Reichweite der radiär vom zentralen Gefäß ausgehenden Sauerstoffdiffusion korrelieren.

3.2.1.2 Histologie des HPM unter verschiedenen Versuchsbedingungen

Manifeste Rezidive nach Bestrahlung in situ weisen ebenso wie Tumoren, die nach Transplantation (von unbehandeltem oder rezidivierendem Spendergewebe) in das vorbestrahlte Tumorbett wuchsen, bei einer Tumorgröße über 500 mg typische Unterschiede zum oben beschriebenen histologischen Bild auf. Sie betreffen vorwiegend die Gewebszusammensetzung: Präparatequerschnitte dieser Tumoren zeigen ausgedehnte nekrotische Flächen, in die oft zahlreiche Tumorcords eingestreut sind, während sich vitale Zellknoten mehr zum Rand hin verlagert finden. Die einzelnen Zellarten und Tumorbereiche lassen jedoch keine für eine vorangehende Tumor- oder Tumorbett-Bestrahlung typische oder spezifische Veränderung erkennen. Die nekrotischen Areale dieser Tumoren erweckten gelegentlich den Eindruck einer Schichtung und zeigen bei der Präparation eine Tendenz zur Vakuolenbildung. Im angrenzenden, das Tumorbett bildenden subkutanen Bindegewebe liegende Arterien waren histologisch meist unauffällig, jedoch fand sich in einigen Präparaten eine Fibrosierung aller Gefäßwandschichten.

Wird hingegen das rezidivierende HPM in ein unbehandeltes Tumorbett transplantiert, so entspricht die Histologie dieser Tumoren exakt der völlig unbehandelter HPM.

3.2.1.3 Morphometrische Bestimmung der Gewebsanteile in Tumoren der Wachstumsversuche

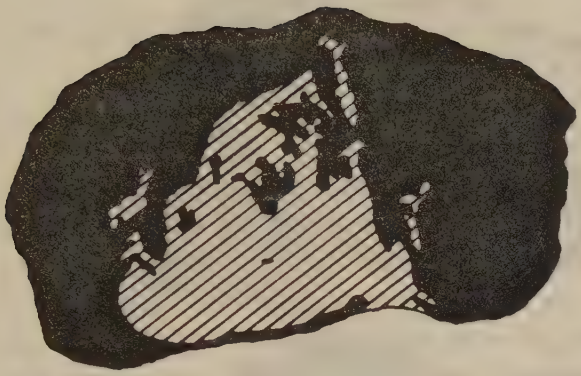
Die beschriebene gute Abgrenzbarkeit des vitalen vom nekrotischen Gewebe und das Fehlen anderer von ihrem Anteil her relevanter Komponenten ermöglichte eine relativ einfache morphometrische Ermittlung des Flächenanteils beider Gewebsarten. Die Werte der Tabelle 17 stammen vorwiegend aus Auswertungen äquatorialer Schnittflächen von Tumoren, die den Meßbereich der Wachstumskurven überschritten hatten.

Der absolut höchste Nekrosenanteil wurde dabei für Rezidive nach in situ Bestrahlung gefunden. Die aufgelisteten Werte zeigen jedoch deutlich, daß auch alle in einem vorbestrahlten Tumorbett wachsenden Tumoren einen Nekrosenanteil von knapp 2/3 der Gesamttumorfläche aufwiesen und somit nur geringfügig unter den Werten der in situ Bestrahlung lagen. Im unbehandelten Tumorbett betrug hingegen der Nekrosenanteil unabhängig von der Vorgeschichte der Transplantate etwa 1/3 des Gesamttumors. Die für 4 Intervalle zwischen Bestrahlung und Transplantation durchgeführte morphometrische Auswertung ließ aus den Nekroseanteilen keinen Hinweis auf eine Änderung der Bedingungen im bestrahlten Tumorbett in Abhängigkeit von diesem Intervall erkennen. Die Abbildungen 17 und 18 zeigen für repräsentative Tumoren aus allen Versuchsgruppen das typische Verteilungsmuster nekrotischen und vitalen Gewebes.

Versuchsgruppe		Zahl ausgewerteter Tumoren	Mittlerer Nekroseanteil (± SEM) (%)	Medianes Tumorgewicht (mg)
unbeh. HPM / unbeh. Tumorbett		2	38,4 ± 1,6	710
rezid. HPM / unbeh. Tumorbett		4	31,1 ± 0,8	815
rezid. HPM in situ		5	65,8 ± 2,0	986
unbeh. HPM / vorbestr. Tumorbett; Intervall:	46 d	3	60,8 ± 1,6	830
	90 d	3	57,8 ± 1,3	723
	185 d	5	57,5 ± 1,3	625
	274 d	5	58,0 ± 1,4	604
rezid. HPM / vorbestr. Tumorbett; Intervall:	54 d	3	67,1 ± 2,5	610
	93 d	3	62,7 ± 2,9	633

Tab. 17: Flächenanteile Nekrose in Tumoren histomorphologisch untersuchter Versuchsgruppen

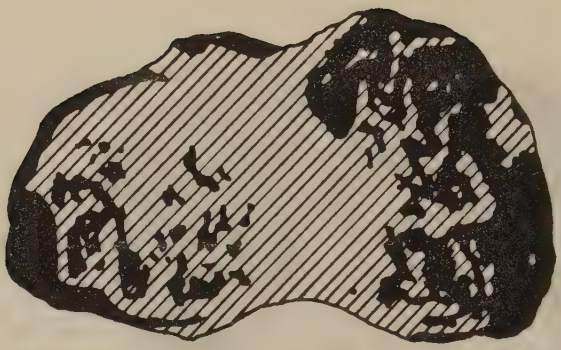
a)



b)

Abb. 17: Gewebszusammensetzung in äquatorialen Schnittpräparaten von Tumoren (Gewicht ca. 700 mg), die im unbehandelten Tumorbett wuchsen.
Nekrose: Schraffiert / Vitales Gewebe: Schwarz
a) Spendertumor unbehandelt
b) Spendertumor rezidivierendes HPM

a)



b)

c)

Abb. 18: Gewebszusammensetzung in äquatorialen Schnittpräparaten von Tumoren (Gewicht ca. 650 mg), die nach Bestrahlung in situ bzw. Transplantation in ein vorbestrahltes Tumorbett wuchsen. Nekrose: Schraffiert / Vitales Gewebe: Schwarz
a) Spender rezidivierendes HPM / vorbestrahltes Tumorbett - Intervall 54 Tage
b) Spender unbehandeltes HPM / vorbestrahltes Tumorbett - Intervall 90 Tage
c) Lokalrezidiv nach 30 Gy/ 300 kV Röntgen
Vgl. den wesentlich höheren Nekroseanteil im bestrahlten Tumorbett gegenüber Abbildung 17!

3.2.2 Histogenese des HPM

3.2.2.1 Das Anwachsen der Tumortransplantate

Die aus einem unbehandelten Spendertumor entnommenen Gewebswürfel bestehen durchschnittlich zu 70 % aus vitalem Gewebe, die nekrotischen Anteile liegen in Form kleiner Inseln zufällig verteilt. 1 Tag nach Transplantation in ein unbehandeltes Tumorbett ist eine pyknotische Umwandlung der Zellkerne im Transplantat zu beobachten, von der lediglich eine dem subkutanen Gewebe anliegende Schicht aus 2 bis 3 Zellagen ausgenommen ist. Bis zum 3. Tag erfolgt eine vollständige zentrale Nekrotisierung. In der äußeren Zellschicht treten in diesem Zeitraum kaum Mitosen auf und der ^3H-Thymidin-Markierungsindex ist als Ausdruck verminderter Proliferation auf Werte von 10 bis 13 % erniedrigt. Erst mit dem Einsprossen von Kapillaren in die Randzonen zwischen dem 3. und 5. Tag nach Transplantation nimmt die Proliferation zu und äußert sich auch in einer sichtbaren Verbreiterung der vitalen Zellschicht. Erst jetzt wird auch makroskopisch ein Tumorwachstum feststellbar.

Ein ähnlicher Ablauf dieser Phase ist auch dann zu beobachten, wenn ein unbehandelter Spender in ein Tumorbett einwächst, das 76 bzw. 175 Tage vor Transplantation bestrahlt wurde. Nekrotisierung des zentralen Tumoranteils, Vaskularisation und Wachstumsbeginn folgen dem gleichen Zeitverlauf und histomorphologischen Muster wie nach Transplantation in ein unbehandeltes Tumorbett.

Transplantatwürfel aus einem rezidivierenden HPM sind durch einen zwischen 30 und 70 % schwankenden Gehalt an nekrotischem Gewebe gekennzeichnet. Das weitere Schicksal der Grafts unter-

scheidet sich in der Mehrzahl nicht von dem oben beschriebenen Muster. Allerdings zeigt ca. ein Drittel der Transplantate eine ungewöhnlich lange Verzögerung des Gefäßanschlusses, die weit über die hier beschriebene Phase hinaus bis zu 3 Wochen nach Transplantation andauern kann.

Abbildung 19 demonstriert den morphometrisch bestimmten Zeitverlauf des Nekroseanteils im Tumor in den ersten 10 Tagen nach Transplantation. Die morphometrisch ermittelten Flächenanteile der Nekrose wurden für diese Darstellung in Volumenanteile umgerechnet (Besprechung des hierfür verwendeten Modells siehe 4.2.1).

Abbildung 20 zeigt den für alle Versuchsgruppen typischen Gewebsaufbau eines HPM in dieser Phase.

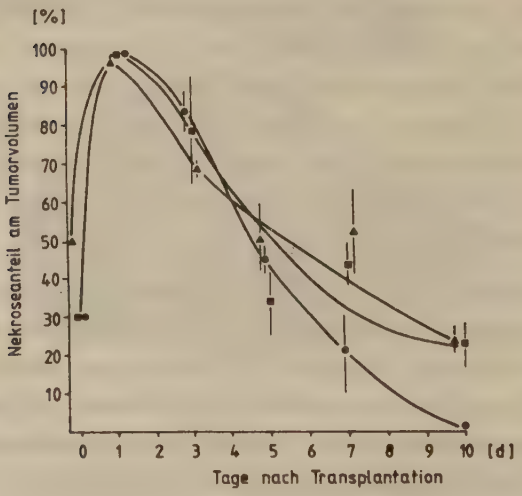
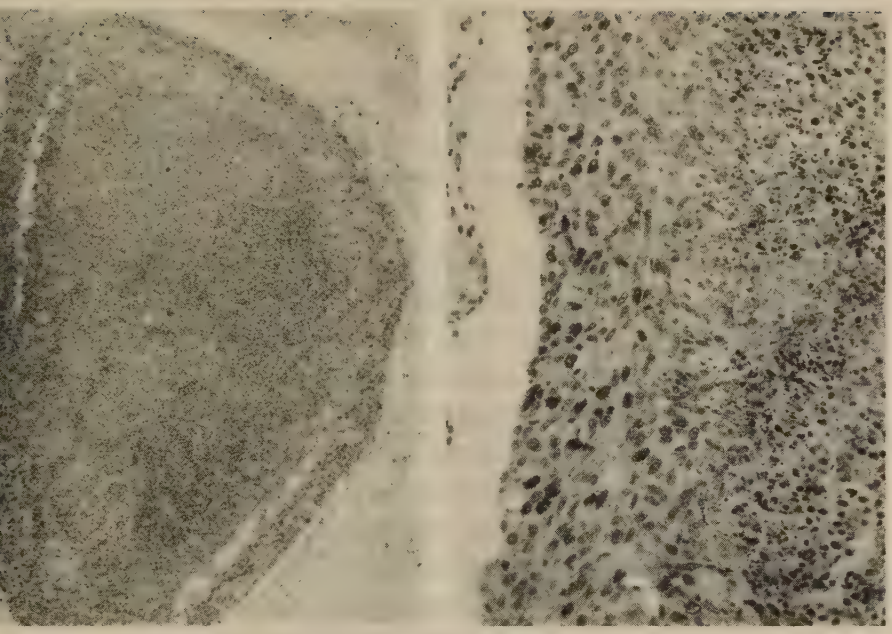


Abb. 19: Verlauf des Nekroseanteils von Tumoren unterschiedlicher Versuchsgruppen in den ersten 10 Tagen nach Transplantation:
● unbeh. HPM / unbeh. Tumorbett
■ unbeh. HPM / vorbestr. Tumorbett - Intervall 76 d
▲ rezid. HPM / unbeh. Tumorbett



a) b)

Abb. 20: Autoradiogramm eines unbehandelten HPM im unbehandelten Situs am 2. Tag nach Transplantation: Typischer Gewebsaufbau mit zentraler Pyknose und randständigem vitalen Gewebssaum von ca. 120 µ Breite, der proliferierende Zellen enthält.
a) Übersicht / b) Ausschnitt aus dem Randbereich mit zahlreichen Zellen in DNS-Synthese

3.2.2.2 Histogenese des HPM im subklinischen und klinischen Bereich unter verschiedenen Versuchsbedingungen

Nach erfolgtem Anschluß an das Gefäßsystem des Wirts nimmt das vitale Gewebe in allen Versuchsgruppen rasch zu. Ein unbehandelter Tumor besteht im unbehandelten Tumorbett bei einem Gewicht von 10 mg praktisch nur noch aus vitalem Gewebe, um dann mit steigender Tumorgröße zunehmend zu nekrotisieren.

Diese Nekrose ist zunächst noch diffus verteilt; erst ab einem Tumorgewicht von 100 bis 200 mg treten typische flächige Nekrosareale auf, die dann die beschriebenen perikapillären Gewebsinseln enthalten.

Histomorphologisch wird der Einfluß einer Tumorbettvorbestrahlung bereits in einem frühen Stadium erkennbar. Bei einem Vorbestrahlungsintervall von 76 Tagen markiert die Tumorgröße von 10 mg die Grenze einer ungehinderten Proliferation. Der minimale Nekroseanteil von 20 % wird bei diesem Gewicht erreicht, um bei 20 mg bereits 40 %, bei 100 mg schließlich 50 bis 60 % zu betragen. Dieser Anteil bleibt mit weiterer Größenzunahme des Tumors annähernd konstant. Nekrotische Areale liegen selbst bei kleinen Tumoren ab 20 mg Tumorgewicht schon zusammenhängend vor, das vitale Gewebe setzt sich entsprechend aus mehr randständigen Tumorknoten und zahlreichen Tumorcords zusammen.

Bei einer Verlängerung des Vorbestrahlungsintervalls von 76 auf 175 Tage erfolgt die Nekrosezunahme verzögert, d. h. sie ist zu höheren Tumorgewichten hin verschoben. Der Endwert liegt mit 50 % etwas niedriger als er für Tumoren der vergleichbaren Versuchsgruppe im Wachstumsexperiment (Intervall 185 Tage) bestimmt wurde.

Eine Mittelstellung zwischen den bisher vorgestellten Versuchsgruppen nimmt die Histogenese des rezidivierenden HPM im unbehandelten Tumorbett ein. Während der Nekroseanteil nicht unter 20 % absinkt, entsprechen die für Tumorgewichte zwischen 500 und 1000 mg gemessenen Nekroseanteile denen des unbehandelten HPM im unbehandelten Situs.

In Abbildung 21 sind diese Ergebnisse graphisch dargestellt, wobei die Nekroseanteile jedoch nicht als Funktion der Zeit, sondern

der Tumorgröße aufgetragen sind. Die logarithmische Abszissenunterteilung erlaubt eine übersichtliche Darstellung besonders der raschen Änderungen der Nekroseanteile in der Frühphase.

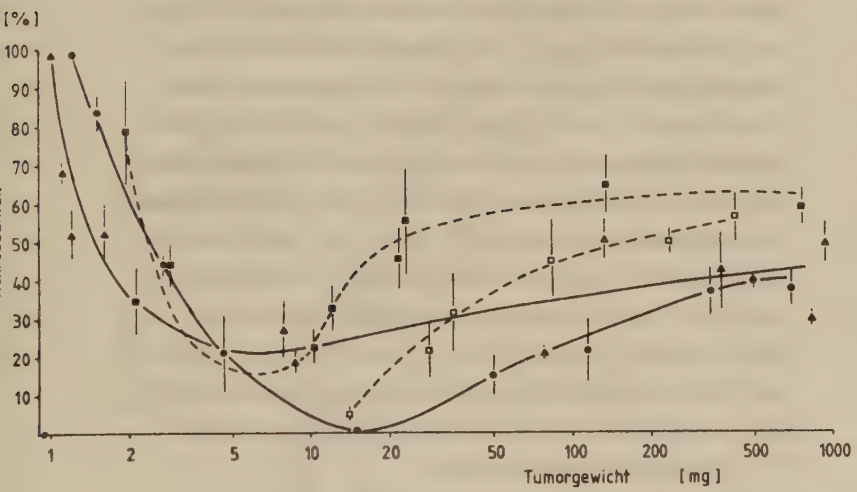


Abb. 21: Nekroseanteil in Abhängigkeit vom Tumorgewicht für verschiedene Versuchsgruppen:
● unbeh. HPM / unbeh. Tumorbett
▲ rezid. HPM / unbeh. Tumorbett
■ unbeh. HPM / vorbestr. Tumorbett - Intervall 76 d
□ unbeh. HPM / vorbestr. Tumorbett - Intervall 175 d

3.2.2.3 Wachstumskurven des nekrotischen und vitalen Tumoranteils sowie des Gesamttumors unter verschiedenen Versuchsbedingungen

Die in den Histogeneseversuchen bestimmten Daten lassen die Erstellung von Wachstumskurven für den Gesamttumor, aber auch differenziert für die Nekrose und für das vitale Gewebe zu. Die entsprechenden Verläufe für die besprochenen Versuchs-

gruppen sind in den Abbildungen 22 bis 25 dargestellt.

Unbehandelter Tumor und rezidivierendes HPM im unbehandelten Tumorbett zeigen im Gesamttumorwachstum in einer ersten Phase das Einschwenken auf das bekannte exponentielle Wachstum. Das durch die Größe des Tumorgrafts definierte Nekrosevolumen ändert sich in den ersten 6 bis 10 Tagen nach Transplantation kaum, der Kurvenverlauf deutet sogar eine Reduktion eventuell als Ausdruck einer Resorption an. Gleichzeitig erfolgt das Wachstum des vitalen Gewebes anfangs mit sehr steiler Rate (Verdopplungszeit zwischen 1 und 2 mg ca. 1,4 Tage), dann mit immer mehr abnehmender Geschwindigkeit. Das Nekrosevolumen wächst zunächst annähernd gleich schnell wie das vitale Gewebe. Bei einer Tumorgröße von ca. 50 mg für das unbehandelte und von ca. 100 mg für das Rezidivtransplantat überholt jedoch die Nekrosezuwachsrate deutlich die gleichzeitig gemessene Wachstumsrate des vitalen Gewebes.

Die großen Streubereiche für das Wachstum des rezidivierenden HPM im unbestrahlten Tumorbett (Abb. 23) liegen in einer Eigenschaft dieser Versuchsgruppe begründet, die nur bei der histologischen Untersuchung zum Ausdruck kommt: Bis zum 24. Tag nach Transplantation zeigte nämlich meist einer der Tumoren einen sehr frühen, soeben erst vaskularisierten Wachstumszustand und hatte bei einem entsprechend niedrigen Tumorgewicht einen hohen Anteil an zentral liegender Nekrose. Diese Tumoren müssen das Intervall zwischen Transplantation und Entnahme in einem ruhenden, nur die Ernährung der äußersten Zellschichten erlaubenden Zustand verbracht haben. Ein ähnliches Verhalten fand sich sonst nur in einem der beiden am Tag 25 entnommenen Tumoren der Versuchsgruppe unbehandelter Spender / vorbestrahltes Tumorbett (Intervall 76 Tage). Der entsprechende Kurvenpunkt in Abbildung 24 wurde deshalb für den Kurvenverlauf vernachlässigt.

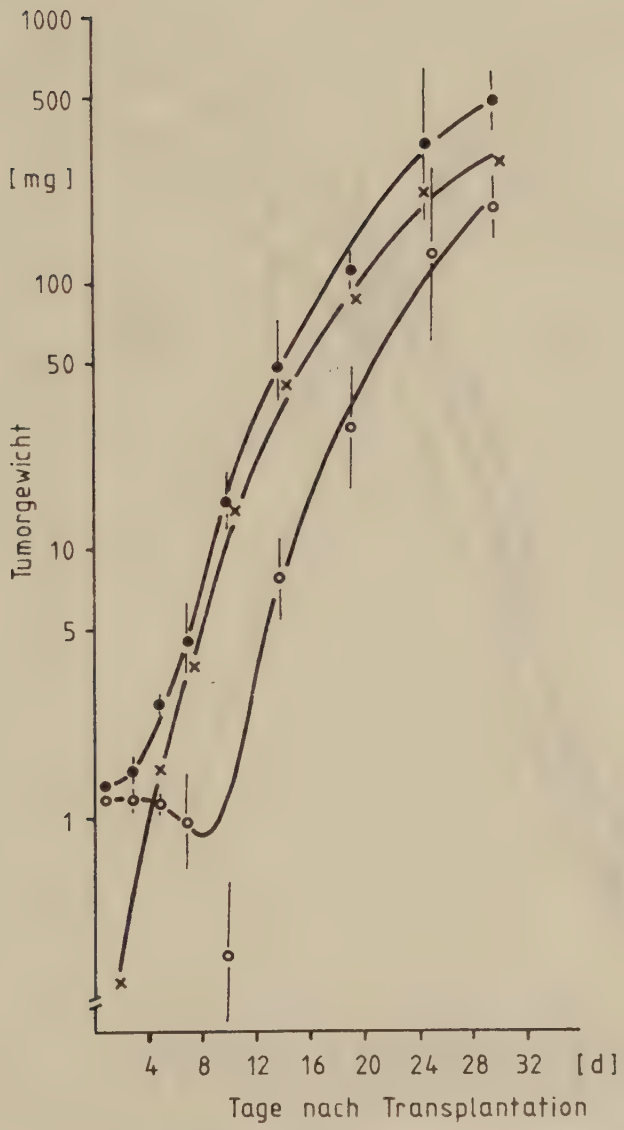


Abb. 22: Wachstum des unbehandelten HPM und seiner Gewebskomponenten im unbehandelten Tumorbett;
● Gesamttumor / ○ Nekrose / × vitales Gewebe

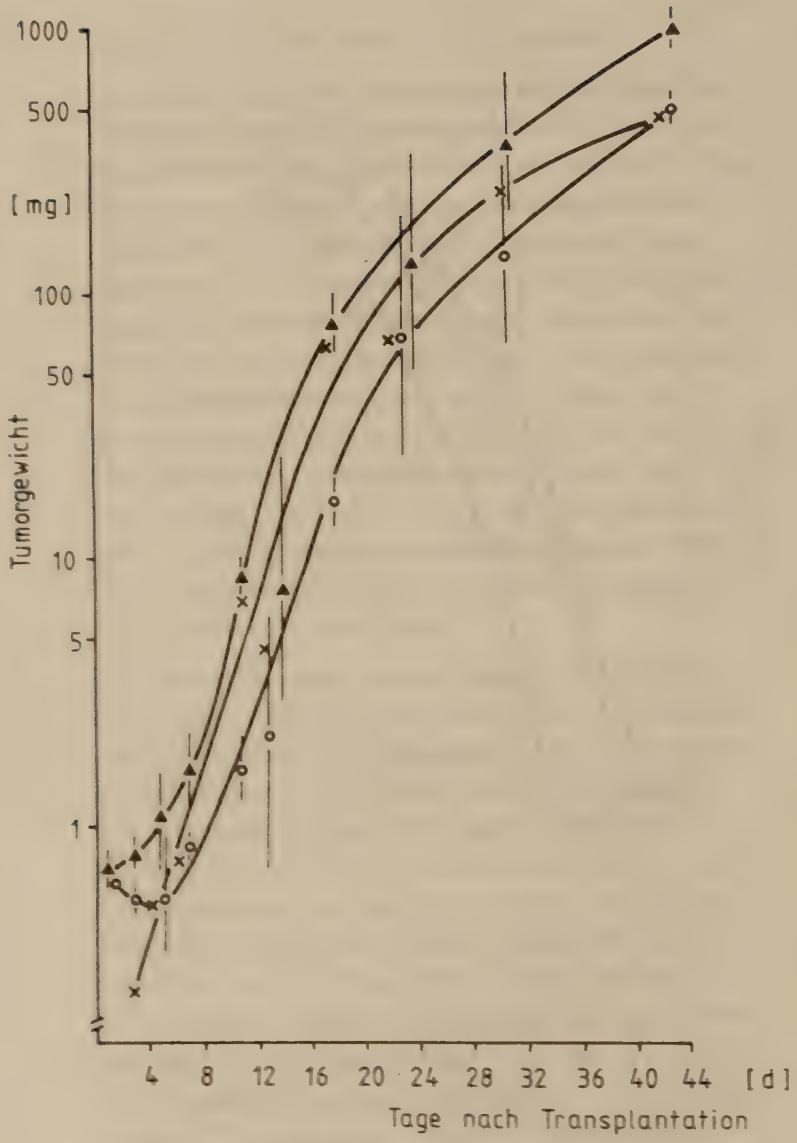


Abb. 23: Wachstum der Rezidivtransplantate und ihrer Gewebskomponenten im unbehandelten Tumorbett;
▲ Gesamttumor / o Nekrose / x vitales Gewebe

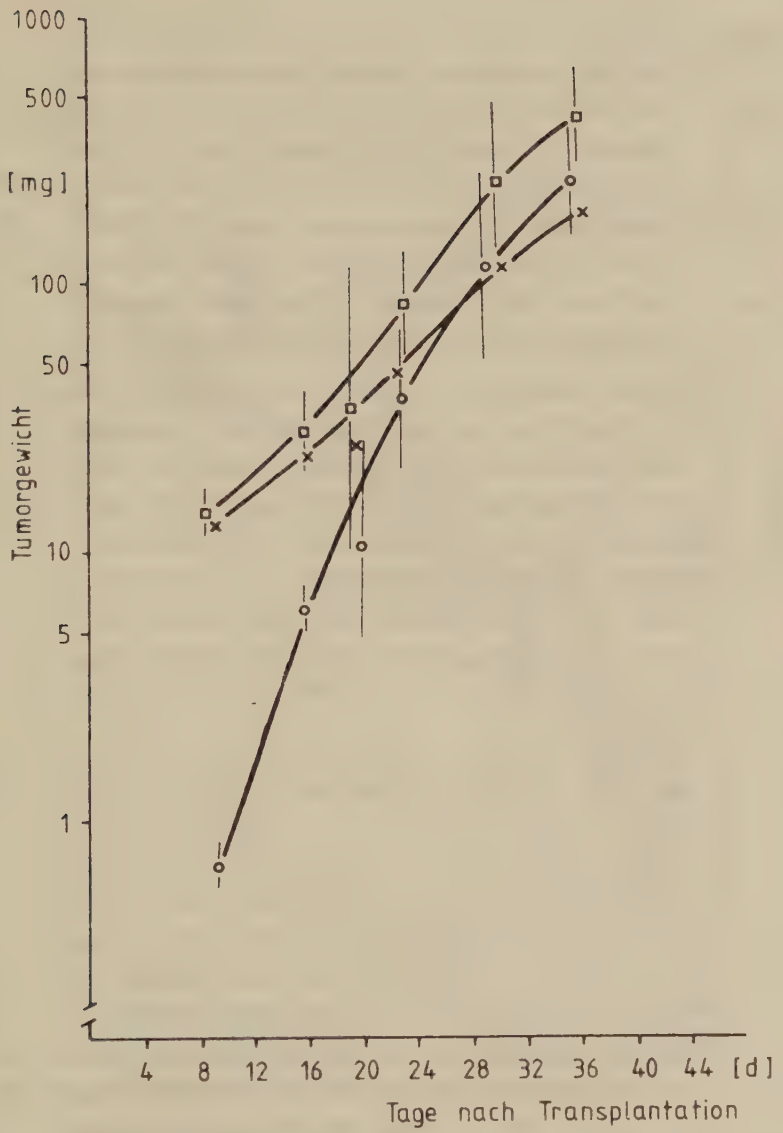


Abb. 24: Wachstum des unbehandelten HPM und seiner Gewebskomponenten im vorbestrahlten Tumorbett (Intervall 175 Tage);
□ Gesamttumor / ○ Nekrose / ✕ vitales Gewebe

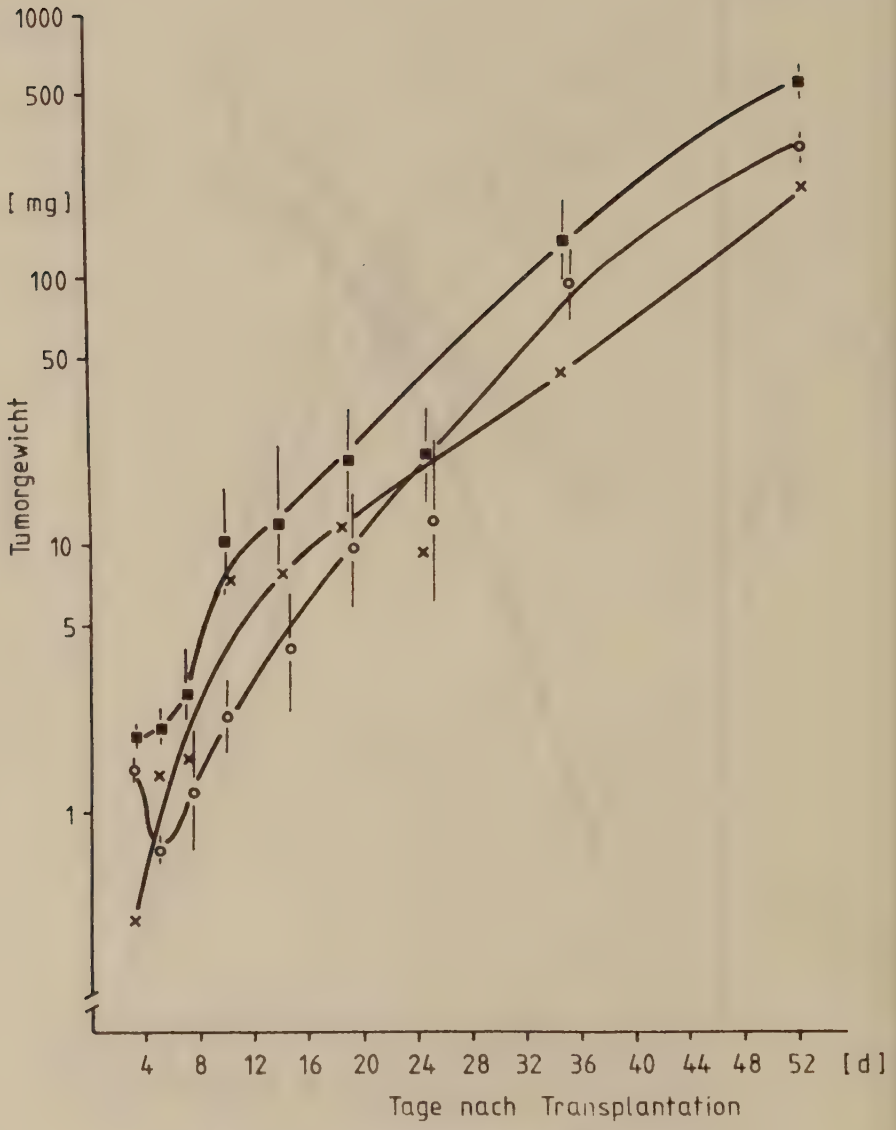


Abb. 25: Wachstum des unbehandelten HPM und seiner Gewebskomponenten im vorbestrahlten Tumorbett (Intervall 76 Tage);
■ Gesamttumor / ○ Nekrose / × vitales Gewebe

Eine Untersuchung der Histogenese im langfristig vorbestrahlten Tumorbett (Intervall 175 Tage) wurde erst am Tag 9 nach Transplantation begonnen. Aus dem Kurvenverlauf von Abbildung 24 ist jedoch zu folgern, daß der Tumor bis zum ersten Entnahmetermin sehr rasch und in ähnlicher Weise wie im unbehandelten Tumorbett gewachsen sein muß. Das Nekrosegewicht ist zu diesem Zeitpunkt entsprechend niedrig, nimmt aber rasch zu und überholt im Gegensatz zu den Kontrollen den Anteil des vitalen Gewebes bei etwa 70 mg Tumorgewicht.

Die Wachstumskurven im vorbestrahlten Tumorbett nach einem Intervall von 76 Tagen demonstrieren ein bis zu 10 mg Tumorgewicht unbehindertes Wachstum (Abb. 25). Bei dieser Größe erfolgt ein auffälliges Abknicken der Wachstumskurven für den Gesamttumor und die vitalen Tumoranteile. Die Wachstumskurve der Nekrose ist hiervon kaum betroffen, so daß sich die Nekrose rasch vergrößert und das absolute Nekrosevolumen die vitalen Tumoranteile bereits bei einem Gesamtgewicht von 20 mg übertrifft.

3.2.2.4 ^{3}H-Thymidin Markierungsindex der untersuchten Tumoren

In einem Teil der Tumoren des Histogeneseversuchs war mit in vivo Pulsmarkierung mit ^{3}H-Thymidin der Markierungsindex L. I. im vitalen Tumorgewebe bestimmt worden. Für jede Versuchsgruppe wurden vergleichbar große Tumoren zusammengefaßt und ihr mittlerer Markierungsindex berechnet (Tab. 18). Die in Abbildung 26 als Funktion des Tumorgewichts aufgetragenen Werte sind in allen Versuchsgruppen annähernd gleich und erreichen ihre Maxima von 18 bis 23 % in Tumoren von 5 bis 50 mg Tumorgewicht, um in größeren Tumoren bis auf 13 bis 16 % abzufallen. Dieser Abfall ist im vorbestrahlten

Versuchs-gruppe	Zahl gewerteter Tumoren	mittleres Tumorgewicht (mg)	mittlerer LI (± SEM)
unbeh. HPM / unbeh. Tumorbett	5	1,2	17,49 ± 2,96
	2	22,5	21,30 ± 1,76
	1	65,0	21,25
	6	135,0	20,67 ± 0,94
	1	2400,0	12,88
rezid. HPM / unbeh. Tumorbett	3	0,9	14,24 ± 0,99
	3	7,1	16,32 ± 3,38
	2	10,5	18,38 ± 0,99
	2	140,0	16,18 ± 3,60
	1	460,0	14,01
unbeh. HPM / vorbestr. Tumorbett - Intervall 76 d	4	1,7	17,59 ± 1,54
	3	4,6	19,81 ± 4,06
	2	12,0	17,10 ± 0,76
	3	31,0	15,95 ± 1,01
	1	450,0	17,00
unbeh. HPM / vorbestr. Tumorbett - Intervall 175 d	1	2,0	19,87
	4	16,2	23,18 ± 1,66
	2	40,0	23,15 ± 0,08
	2	130,0	17,09 ± 0,61

Tab. 18: Mittlere Markierungsindizes von autoradiographisch untersuchten Tumoren des Histogeneseversuchs

Tumorbett beim 76 Tage-Intervall zu niedrigeren Gewichten verschoben (zwischen 5 und 10 mg Tumorgewicht), beim 175 Tage-Intervall tritt er bei einem Tumorgewicht zwischen 50 und 100 mg auf. Das rezidivierende HPM im unbehandelten Tumorbett weist eine Verminderung der Markierungsindizes um einige Prozent in allen Größenbereichen gegenüber den unbehandelten Kontrollen auf.

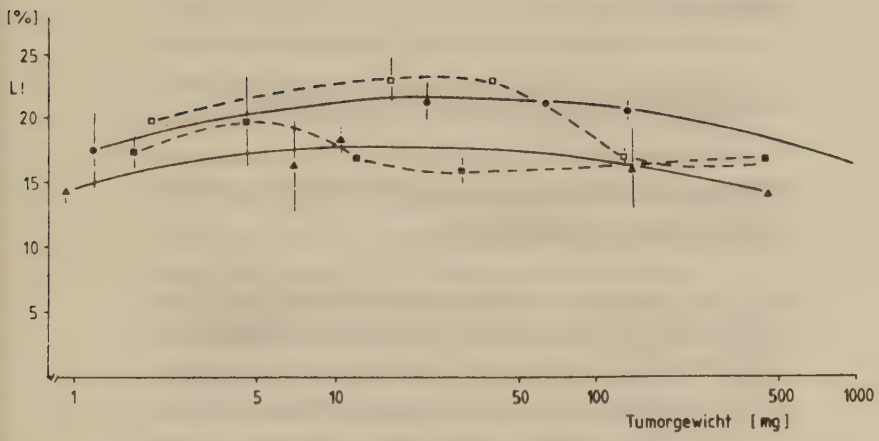


Abb. 26: 3H-Thymidin Markierungsindex von Tumoren der einzelnen Versuchsgruppen in Abhängigkeit vom Tumorgewicht:
● unbeh. HPM / unbeh. Tumorbett
▲ rezid. HPM / unbeh. Tumorbett
■ unbeh. HPM / vorbestr. Tumorbett - Intervall 76 d
□ unbeh. HPM / vorbestr. Tumorbett - Intervall 175 d

4. DISKUSSION

4.1 Funktionelle Charakterisierung des Tumorbetteffekts

4.1.1 Erläuterung der Parameter für die Beschreibung und graphische Darstellung des Tumorbetteffekts

Das HPM unterliegt nach subkurativer Bestrahlung in situ in der Phase des Wiederwachstums einem ausgeprägten retardierenden Einfluß. Experimentell ließ sich in dieser Arbeit eine ähnliche Wachstumsbeeinflussung durch eine isolierte Tumorbettbestrahlung mit nachfolgender Transplantation eines Tumors erzielen. Zur Quantifizierung dieses Tumorbetteffekts (TBE) bieten sich die Veränderungen im Wachstumsverhalten an, die konstant in allen vorgestellten Wachstumskurven zu beobachten waren: Dies ist einmal gegenüber den Kontrollen verlängerte Latenzzeit bis zum Eintritt in den Meßbereich, zum anderen die Reduktion der Wachstumsgeschwindigkeit im makroskopischen Wachstumsbereich selbst. Da das Ausmaß dieser Verlangsamung innerhalb des Beobachtungsbereichs von 50 bis 500 mg Tumorgewicht stark variiert, werden drei Parameter zur Charakterisierung des TBE herangezogen und berechnet:

1) Die $\Delta T_{100\ mg}$ als Differenz der Zeit bis zum Erreichen von 100 mg Tumorgewicht zwischen Versuchsgruppe und zugeordneter Kontrolle
2) der Quotient aus der medianen Verdopplungszeit zwischen 50 und 100 mg der Versuchsgruppe und Kontrolle als $SR_{50/100\ mg}$ (SR = slope ratio)
3) der Quotient der Verdopplungszeiten zwischen 250 und 500 mg als $SR_{250/500\ mg}$.

Die Fehlerbereiche wurden dabei aus den Werten des mittleren Fehlers des Mittelwerts (SEM) der Versuchsgruppe gegen den Medianwert der Kontrolle gebildet. Insgesamt erlaubt diese differentielle Betrachtungsweise im Vergleich zu anderen in der Literatur benutzten Parametern wie der Überlebenszeit des Tumorträgers oder nur eines einzelnen Quotienten der Wachstumsraten für den gesamten Meßbereich eine genauere Analyse des Wachstums im vorbestrahlten Tumorbett.

Die auf diese Weise erstellten Parameter können nun graphisch gegen das Intervall zwischen Bestrahlung und Transplantation aufgetragen werden (wie es unter 4.1.2 für das Wachstum unbehandelter HPM im röntgenvorbestrahlten Situs exemplarisch durchgeführt wird). Bei diesem Vorgehen bleibt die zusätzliche Zeit bis zur Manifestation des Wachstumseffekts, von der Transplantation an gerechnet, unberücksichtigt. Dieser Zeitraum erscheint für die Größen $\Delta T_{100\ mg}$ und $SR_{50/100\ mg}$ noch vertretbar gering, erstreckt sich aber für den $SR_{250/500\ mg}$ teilweise über 6 bis 7 Wochen. Um den Zeitverlauf des TBE dadurch nicht zu verfälschen, wurde deshalb für alle Parameter eine Auftragung gegen die 'Echtzeit', d. h. den Zeitpunkt der tatsächlichen Manifestation bezogen auf den Zeitpunkt der Bestrahlung, gewählt. Die $\Delta T_{100\ mg}$ wurde also beim Erreichen von 100 mg Tumorgewicht, der Parameter $SR_{50/100\ mg}$ bei einer Tumorgröße von 70 mg und der $SR_{250/500\ mg}$ bei 350 mg 'gemessen'. Diese Darstellung der Daten erleichtert darüberhinaus die Abschätzung, wie groß beispielsweise auch für eine in situ Bestrahlung der TBE zu einem beliebigen Zeitpunkt nach Bestrahlung sein wird.

4.1.2 Zeitverlauf des TBE

4.1.2.1 Zeitverlauf des TBE für das unbehandelte HPM im vorbestrahlten Tumorbett (30 Gy/300 kV)

Die mit Röntgenbestrahlung durchgeführten Versuche beschreiben den Zeitverlauf des TBE zwischen 0 und 300 Tagen (Abb. 27 und 28, Tab. 19). Für den Quotienten der Verdopplungszeiten $SR_{50/100\ mg}$ gilt dabei, daß der Einfluß einer Tumorbettvorbestrahlung vom 10. oder 15. Tag an rasch zunimmt und am 41. und 123. Tag Maxima von 3,8 bzw. 3,4 erreicht. Ein danach einsetzender Abschwung führt bis zum 200. Tag nach Bestrahlung auf einen Wert von 1,4 und bis zum 300. Tag auf 1,3 zurück. Dieser Verlauf zeigt eine nahezu vollständige Erholung bis zum 300. Tag an. Etwa parallel hierzu verläuft die Kurve für die $\Delta T_{100\ mg}$. Dies legt nahe, daß die zwischen 50 und 100 mg beobachtete Retardierung auch subklinisch besteht und der im bestrahlten Tumorbett beobachteten Latenzzeiterhöhung zugrunde liegt. Der unmittelbare Beweis hierfür wird durch die direkte Größenmessung im Histogenesexperiment geliefert, die ein Auseinanderweichen der Wachstumskurven von Versuchsgruppe und Kontrolle bereits im frühen subklinischen Bereich erkennen ließ.

Der Parameter der Wachstumsgeschwindigkeit zwischen 250 und 500 mg folgt einem anderen, dem $SR_{50/100\ mg}$ gegenläufigen Zeitverlauf: Je kürzer das Intervall zwischen Bestrahlung und Transplantation gewählt wird, umso stärker prägt sich der Einfluß einer Tumorbettvorbestrahlung auf die Wachstumsgeschwindigkeit in diesem Größenbereich aus. So wurde für das Intervall von 3 Stunden die stärkste Reduktion der Wachstumsrate um einen Faktor von 5,6 am 42. Tag nach Bestrahlung ge-

messen. Das Einschwenken des TBE-Verlaufs auf ein Plateau mit einem Quotienten von 2,0 ab dem 90. Tag deutet nach Erholung eines 'akuten' Effekts die Persistenz eines Restschadens bis zum 300. Tag nach Bestrahlung an. In gleicher Weise zeichnen sich die für diese Zeiträume bestimmten Nekroseanteile der Tumoren der Versuchsgruppen durch einen konstant hohen Wert um die 60 % aus und dürften somit den histomorphologischen Ausdruck dieses Restschadens darstellen. Die für das Plateau geltenden Ergebnisse stimmen sowohl mit den von Hewitt und Blake (17) und Summers (50) angegebenen Zeiten für das Andauern des TBE als auch mit der Stärke der von ihnen beobachteten Wachstumsreduktion überein.

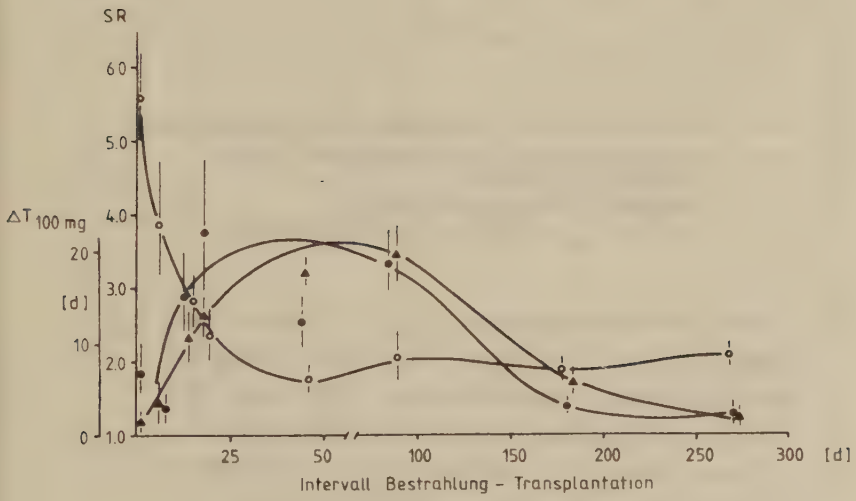


Abb. 27: Zeitverlauf der TBE-Parameter für das Wachstum des unbehandelten HPM im vorbestrahlten Tumorbett (30 Gy/ 300 kV Röntgen)
Abszisse: Intervall Bestrahlung - Transplantation
▲△ $T_{100\ mg}$ • $SR_{50/100\ mg}$ ○ $SR_{250/500\ mg}$

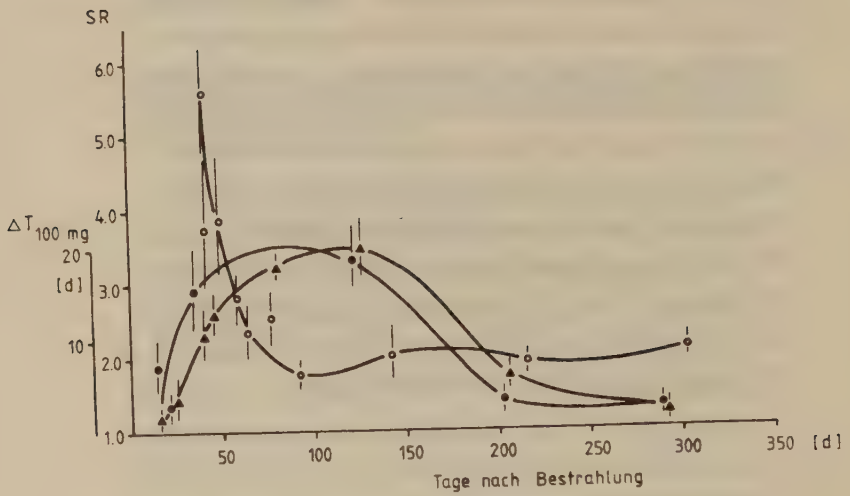


Abb. 28: Zeitverlauf der TBE-Parameter für das Wachstum des unbehandelten HPM im vorbestrahlten Tumorbett (30 Gy/ 300 kV Röntgen)
Abszisse: Manifestationszeitpunkt
▲$\Delta T_{100\ mg}$ ● $SR_{50/100\ mg}$ ○ $SR_{250/500\ mg}$

Die bei dieser Betrachtungsweise in zwei Größenbereiche zerlegten Wachstumskurven demonstrieren, daß Ausprägung und Rückbildung des TBE dynamisch gesehen werden müssen: Bei frühen Bestrahlungs-Transplantationsintervallen gelingt es den Tumoren, noch vor der Ausprägung des vollen TBE relativ unbehindert bis weit in den klinischen Bereich zu wachsen, um dann umso stärker vom Einfluß der Tumorbettbestrahlung getroffen zu werden. Später transplantierte Tumoren unterliegen bereits vor Eintritt in den Meßbereich einem TBE und zeigen deshalb von vornherein ein an die veränderten Bedingungen adaptiertes, konstant verlangsamtes Wachstum. Mit zunehmender

Intervall Bestrahlung Transplantation	ΔT_{100} mg (d) (-/+ SEM)	gemessen (d nach Transplantation)	$SR_{50/100}$ mg (-/+ SEM)	gemessen (d nach Transplantation)	$SR_{250/500}$ mg (-/+ SEM)	gemessen (d nach Transplantation)
3 h	1,53 (0,33 - 2,84)	16,5	1,87 (1,58 - 2,29)	15,0	5.64 (5,06 - 6,22)	42,0
6 d	3,79 (1,61 - 6,29)	19,0	1,35 (1,18 - 1,56)	18,0	3,87 (3,18 - 4,74)	43,0
14 d	10,73 (7,95 - 13,84)	26,0	2,91 (2,40 - 3,50)	22,0	2,83 (2,48 - 3,13)	45,0
18 d	12,81 (10,34-15,51)	23,0	3,76 (2,94 - 4,80)	23,5	2,36 2,02 - 2,75)	46,2
46 d	17,94 (16,68-19,26)	34,4	2,51 (2,18 - 2,88)	31,5	1,76 (1,57 - 1,96)	47,0
90 d	19,73 (16,75-22,98)	36,2	3,37 (2,96 - 3,80)	33,5	2,09 (1,76 - 2,46)	53,5
184 d	5,96 (4,49 - 7,52)	22,0	1,39 (1,22 - 1,56)	21,0	1,91 (1,76 - 2,08)	32,0
274 d	2,04 (0,91 - 3,24)	18,5	1,33 (1,19 - 1,46)	16,5	2,15 (1,97 - 2,33)	27,8

Tab. 19: TBE-Parameter für das Wachstum des unbehandelten HPM im vorbestrahlten Tumorbett (30 Gy/ 300 kV Röntgen)

Rückbildung des TBE sind die Tumoren dann wieder in der Lage, relativ unbeeinträchtigt in den meßbaren Bereich zu wachsen und werden erst mit dem Erreichen einer größeren Tumormasse durch den Restschaden des Tumorbetts sichtbar in ihrem Wachstum limitiert.

4.1.2.2 Zeitverlauf des TBE für transplantierte Rezidive im vorbestrahlten Tumorbett (30 Gy/ 300 kV)

Die Erstellung der TBE-Parameter für Rezidivtransplantate erfolgte über den Vergleich mit der zugeordneten Kontrolle von Rezidivtransplantaten im unbehandelten Situs. Für die drei untersuchten Intervalle (54, 93 und 185 Tage) ergibt sich ein mit dem des unbehandelten HPM nahezu identischer Verlauf des TBE (Abb. 29, Tab. 20): Die Maxima für die $\Delta T_{100\ mg}$ und den $SR_{50/100\ mg}$ liegen zwischen 50 und 150 Tagen, der $SR_{250/500\ mg}$

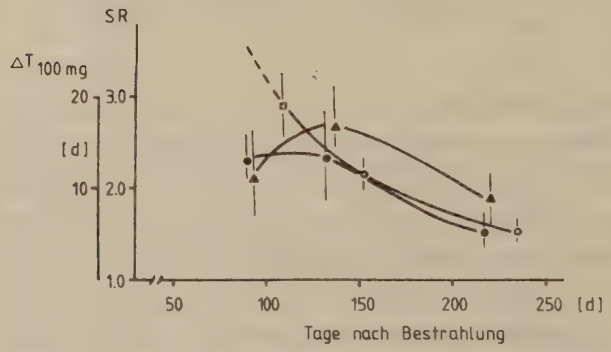


Abb. 29: Zeitverlauf der TBE-Parameter für das Wachstum von Rezidivtransplantaten im vorbestrahlten Tumorbett (30 Gy/ 300 kV Röntgen)
Abszisse: Manifestationszeitpunkt
▲△ $T_{100\ mg}$ ● $SR_{50/100\ mg}$ ○ $SR_{250/500\ mg}$

nimmt mit zunehmendem Intervall als Ausdruck einer Erholung ab. Da durch die Bearbeitung der Wachstumsdaten der Einfluß der großen Latenzzeiten der Rezidivtransplantate gegenüber Transplantaten des unbehandelten HPM in einem unbehandelten Situ eliminiert wird, bestätigen diese Ergebnisse zudem die Eignung der gewählten TBE-Parameter zur Charakterisierung des reinen TBE.

4.1.3 Weitere Charakteristika des TBE

4.1.3.1 Vergleich des TBE nach Vorbestrahlung mit 30 Gy/ 300 kV Röntgenstrahlen und 33 Gy/ 1 MeV Elektronen

Unter 3.1.7.1 wurden die Relative Biologische Wirksamkeit der 1 MeV Elekronen für die akute Hautschädigung von 0,92 sowie die Übernahme dieses Werts für die Dosierung der Tumorbettvorbestrahlung abgeleitet. Eine Tumorbettbestrahlung mit 33 Gy/ 1 MeV Elektronen sollte deshalb das Wachstum des unbehandelten HPM in gleichem Ausmaß wie eine Vorbestrahlung mit 30 Gy/ 300 kV Röntgen beeinflussen.

Der in Abbildung 30 dargestellte Zeitverlauf und die zugehörigen Parameter der Tabelle 21 für den TBE nach Vorbestrahlung eines Feldes von 26 mm Durchmesser sind durch einen Abfall des $SR_{50/100\ mg}$ vom 60. zum 120. Tag nach Bestrahlung gekennzeichnet. Der $SR_{250/500\ mg}$ steigt jedoch von Werten um 1,5 zwischen dem 75. und 100. Tag auf 2,6 130 Tage nach Bestrahlung an.

Der TBE im Wachstumsbereich zwischen 50 und 100 mg erscheint dabei dem nach Röntgenbestrahlung noch vergleichbar, d. h. er bewirkt eine ähnlich starke Reduktion der Wachstumsrate. Die relativ niedrige $\Delta T_{100\ mg}$ für das 93 Tage-Intervall ist Folge der

Intervall Bestrahlung Transplantation	$\Delta T_{100\ mg}$ (d) (-/+ SEM)	gemessen (d nach Transplantation)	$SR_{50/100\ mg}$ (-/+ SEM)	gemessen (d nach Transplantation)	$SR_{250/500\ mg}$ (-/+ SEM)	gemessen (d nach Transplantation)
54 d	11,20 (6,81 - 16,15)	39,5	2,29 (2,08 - 2,57)	37,0	2,89 (2,56 - 3,24)	56,0
93 d	16,70 (12,85-21,01)	45,0	2,29 (1,86 - 2,85)	41,5	2,13 (1,98 - 2,32)	60,5
185 d	8,44 (5,75 - 11,35)	36,5	1,53 (1,36 - 1,73)	35,0	1,52 (1,39 - 1,65)	47,0

Tab. 20: TBE-Parameter für das Wachstum von Rezidivtransplantaten im vorbestrahlten Tumorbett (30 Gy/ 300 kV Röntgen)

Intervall Bestrahlung Transplantation	$\Delta T_{100\ mg}$ (d) (-/+ SEM)	gemessen (d nach Transplantation)	$SR_{50/100\ mg}$ (-/+ SEM)	gemessen (d nach Transplantation)	$SR_{250/500\ mg}$ (-/+ SEM)	gemessen (d nach Transplantation)
15 d	36,71 (32,97-40,75)	51,5	3,33 (3,09 - 3,59)	47,5	1,56 (1,46 - 1,66)	62,0
47 d	28,63 (25,11-32,47)	43,0	2,61 (2,38 - 2,86)	40,0	1,50 (1,37 - 1,64)	54,0
93 d	9,46 (7,22 - 11,88)	24,5	2,33 (2,21 - 2,45)	21,0	2,65 (2,35 - 2,99)	36,0

Tab. 21: TBE-Parameter für das Wachstum des unbehandelten HPM im vorbestrahlten Tumorbett (33 Gy/ 1 MeV Elektronen)

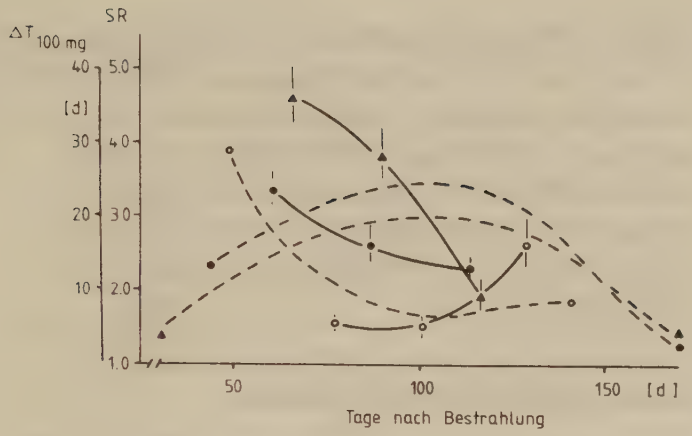


Abb. 30: Zeitverlauf der TBE-Parameter für das Wachstum des unbehandelten HPM im vorbestrahlten Tumorbett (33 Gy/ 1 MeV Elektronen)
Abszisse: Manifestationszeitpunkt
▲ $\Delta T_{100\ mg}$ ● $SR_{50/100\ mg}$ ○ $SR_{250/500\ mg}$
gestrichelt - Verlauf nach Röntgenstrahlen

größeren Latenzzeit der zugeordneten Kontrolle. Eine Korrektur um diese zusätzliche Latenz von ca. 10 Tagen würde den Wert sowohl auf der Zeitachse vorverlegen als ihn auch auf der Ordinate anheben. Dadurch würde die $\Delta T_{100\ mg}$ wieder parallel zum $SR_{50/100mg}$ verlaufen und sich auch nach Tumorbettbestrahlung mit 1 MeV Elektronen aus der bereits subklinisch bestehenden Retardierung begründen.

Die Wachstumsbeeinflussung zwischen 250 und 500 mg verhält sich dagegen entgegengesetzt zu dem nach Röntgenbestrahlung beobachteten Verlauf. Die niedrigen Werte des $SR_{250/500\ mg}$ für das 15 und das 47 Tage-Intervall werden dabei zum geringeren Teil auch dadurch bedingt, daß die zugehörigen Kontrollen eine gegenüber anderen Kontrollen verlangsamte Wachstumsrate aufwiesen, wobei jedoch eine Berechnung aus den Werten der gemeinsamen Kontrolle den Quotienten nur um 0,2 anheben würde. Der

beobachtete Zeitverlauf ist deshalb als reell anzusehen. Möglicherweise kommt in den niedrigen $SR_{250/500\ mg}$-Werten dieser Intervalle ein Einfluß der Tiefendosisverteilung zum Ausdruck, der die 'akute' Phase des TBE betrifft, wie sie bis zum 90. Tag nach Röntgenbestrahlung abgegrenzt werden konnte. Unwahrscheinlich erscheint hingegen eine qualitativ veränderte Pathogenese des TBE nach 1 MeV Elektronen als Ursache des abweichenden Zeitverlaufs.

4.1.3.2 Die Volumenabhängigkeit des Tumorbetteffekts

Normalgewebe zeigen in der Dosisabhängigkeit ihrer Schädigung einen deutlichen Einfluß des Bestrahlungsvolumens (65). In dieser Arbeit konnte dies z.B. für die akute Hautreaktion nach Bestrahlung geobachtet werden: Die Abheilung der feuchten Desquamation verlief im bestrahlten Feld von 15 und 17,5 mm Durchmesser wesentlich rascher als in einem Hautfeld von 26 mm Durchmesser. Da überlebende Hautklone nach 30 Gy im Feld kaum beobachtet werden, erfolgt die Reepithelialisierung vom Feldrand aus; das kleinere Feld ist hierbei natürlich begünstigt.

Das subkutane Bindegewebe des Tumorbetts sollte aus dieser Überlegung heraus in gleicher Weise einer Volumenabhängigkeit unterliegen. Die TBE-Parameter der hierzu durchgeführten Versuche ergeben jedoch keinen eindeutigen Hinweis auf die Existenz eines solchen Volumeneffekts im untersuchten System (Tab. 22 und Tab. 23): Bei einem Transplantationsintervall von 47 Tagen deutet sich zwar eine geringfügig kleinere Retardierung des Wachstums im Feld von 15 mm Durchmesser an, ohne jedoch signifikante Unterschiede zu den Verhältnissen im 17,5 und 26 mm Feld zu erreichen. Dagegen fällt für das 15 Tage-Intervall die beobachtete Verlangsamung im kleineren Feld sogar stärker aus als im großen Feld.

Intervall Bestrahlung Transplantation	Felddurchmesser (mm)	$\triangle T_{100\ mg}$ (d) (-/+ SEM)	$SR_{50/100\ mg}$ (-/+ SEM)	$SR_{250/500\ mg}$ (-/+ SEM)
15 d	26 (Gesamtgruppe)	33,71 (32,97-40,75)	3,33 (3,09 - 3,59)	1,56 (1,46 - 1,66)
	17,5 (Gesamtgruppe)	34,81 (29,31-41,02)	3,94 (3,57 - 4,33)	1,75 (1,56 - 1,96)
47 d	26	28,63 (25,11-32,47)	2,61 (2,38 - 2,86)	1,50 (1,37 - 1,64)
	17,5	21,01 (17,73-24,62)	2,78 (2,60 - 2,96)	1,63 (1,54 - 1,73)
	15	23,79 (22,31-25,34)	2,11 (1,83 - 2,49)	1,47 (1,29 - 1,67)

Tab. 22: TBE-Parameter in Abhängigkeit vom Durchmesser des Bestrahlungsfeldes (33 Gy/ 1 MeV Elektronen - Intervalle 15 und 47 Tage)

Felddurchmesser	Klasse	Abstand (mm)	$\triangle T_{100\ mg}$ (d) (-/+ SEM)	$SR_{50/100\ mg}$ (-/+ SEM)	$SR_{250/500\ mg}$ (-/+ SEM)
26 mm	I	9,7	31,39 (25,98-37,56)	3,03 (2,56 -3,59)	1,64 (1,38 -1,95)
	II	7,2	48,00 (40,67-56,32)	3,53 (3,14 -3,97)	1,60 (1,45 -1,76)
	III	4,7	32,33 (24,28-38,25)	3,44 (3,06 -3,87)	1,44 (1,38 -1,49)
15 mm	I	6,4	18,73 (13,68-24,71)	4,21 (3,36 -5,28)	2,16 (1,98 -2,35)
	II	4,6	53,95 (49,85-58,31)	3,92 (3,51 -4,37)	1,72 (1,34 -2,19)
	III	2,9	33,96 (24,55-45,69)	3,62 (2,87 -4,57)	1,37 (1,23 -1,53)

Tab. 23: TBE-Parameter in Abhängigkeit vom mittleren Abstand Tumormitte - Feldrand für Bestrahlungsfelder von 26 bzw. 17,5 mm Durchmesser (33 Gy/ 1 MeV Elektronen - Intervall 15 Tage)

Die Erstellung der TBE-Parameter für die beim 15 Tage-Intervall gebildeten Klassen (Klassierung nach dem Abstand Tumormitte - Feldrand) zeigt für das 26 mm Feld im Bereich zwischen 250 und 500 mg, für das 17,5 mm-Feld im gesamten Wachstumsbereich eine Tendenz zur Abnahme des TBE mit zunehmender Nähe der Tumormitte zum Feldrand. Dies dürfte jedoch der erwähnten Beobachtung eines 'marginalen Wachstums' entsprechen. Es handelt sich hierbei zwar ebenfalls um ein volumenabhhängiges Phänomen, das jedoch das Auswachsen des Tumors in unbehandeltes Gewebe beinhaltet.

Aus den vorliegenden Ergebnissen darf dennoch die Existenz einer Volumenabhängigkeit des TBE nicht generell verneint werden. Vielmehr wird im gewählten Versuchssystem der Nachweis durch methodische Schwierigkeiten limitiert, wobei einmal die mangelnde Reproduzierbarkeit einer exakt zentralen Transplantation, zum andern aber die geringe Variierbarkeit der Feldgröße auf der NMRI-Maus zu nennen ist. Eine systematische Untersuchung des Volumeneffekts empfiehlt sich daher an größeren Versuchstieren wie Ratte oder Schwein.

Die Verwendung größerer Versuchstiere würde zudem auch eine Abgrenzung des funktionellen Tumorbetts in die Tiefe erlauben, wie sie experimentell z.B. durch Tumorbettbestrahlung mit Elektronen unterschiedlicher Energie erreichbar wäre. Der von dem nach Röntgenvorbestrahlung abweichende Verlauf der TBE-Parameter für 1 MeV Elektronen könnte wie erwähnt durch die Tiefendosisverteilung bedingt sein. Der ermittelte TBE läßt deshalb keine Aussage zu der Fragestellung zu, wie weit sich das Tumorbett mit seiner Funktion wie z.B. der Bereitstellung größerer Gefäße in die Tiefe erstreckt.

4.1.3.3 Die Abhängigkeit des TBE vom Transplantationssitus

Die Transplantation in einen dorsalen unbehandelten Situs führte bereits für das unbehandelte HPM zu einer Reduktion der Wachstumsrate um einen Faktor 1,7 zwischen 50 und 100 mg und 1,3 zwischen 250 und 500 mg gegenüber dem thorakalen Situs. Nach Vorbestrahlung eines 15 mm-Feldes und Transplantation eines unbehandelten Tumors nach 93 Tagen ergab sich im Gegensatz zu den anderen mit Elektronenbestrahlung durchgeführten Versuchen ein TBE, der sich zwar noch in einer beträchtlichen Latenzzeit ($\Delta T_{100\ mg}$), aber kaum mehr in einer weiteren Wachstumsreduktion ausdrückte (Tab. 24). Dieses Verhalten könnte auf Grund des kleinen Felddurchmessers als Ausdruck einer Volumenabhängigkeit gewertet werden, jedoch ist dies auf Grund der negativen Ergebnisse im thorakalen Situs eher auszuschließen. Naheliegender erscheint eine Erklärung, die die Interpretation des verlangsamten Kontrollwachstums als Folge suboptimaler Versorgungsbedingungen im dorsalen unbestrahlten Situs berücksichtigt. Diese Bedingungen werden nach Tumorbettbestrahlung wesentlich eher wiedererreicht und bewirken deshalb nur eine sehr geringe Ausprägung der spezifischen TBE-Parameter.

Die Ergebnisse dieses Versuchs lassen den dorsalen Transplan-

Intervall Bestrahlung Transplantation	$\Delta T_{100\ mg}$ (d) (-/+ SEM)	$SR_{50/100\ mg}$ (-/+ SEM)	$SR_{250/500\ mg}$ (-/+ SEM)
93 d	22,47 (18,96 - 26,26)	1,24 (1,17 - 1,33)	1,15 (1,02 - 1,29)

Tab. 24: TBE-Parameter des unbehandelten HPM im vorbestrahlten dorsalen Tumorbett von 15 mm Durchmesser (30 Gy/ 1 MeV Elektronen)

tationssitus der NMRI-Maus als Testsystem für den TBE ungeeignet erscheinen. Das makroskopisch bereits wesentlich spärlicher ausgebildete subkutane lockere Bindegewebe im dorsalen Situs limitiert die Versorgungsbedingungen des schnell wachsenden HPM bereits ohne weitere Behandlung sehr stark und bedingt dadurch Wachstumsmuster, die nicht von zusätzlichen therapeutischen Einflüssen zu unterscheiden sind. Während ein Vergleich mit anderen Transplantationssitus in dieser Arbeit nicht durchgeführt wurde, unterscheidet Denekamp (7) im subkutanen Gewebe der Maus verschiedene Situs bezüglich ihrer Eignung als Tumorsitz in Wachstumsexperimenten. Als ungeeignet bezeichnet sie dabei in gleicher Weise jene Situs, die von vornherein die Gefäßversorgung des Tumors limitieren wie z.B. das subkutane Gewebe von Kopf, Schwanz oder Fuß. Eine Beeinträchtigung des Tumorwachstums im dorsalen Situs wie in der vorliegenden Arbeit wurde allerdings von ihr nicht gefunden.

Im Zusammenhang mit diesen Ergebnissen erscheinen auch Untersuchungen über die Abhängigkeit des TBE von der endogenen Wachstumsrate eines Tumors interessant. Von Hewitt und Blake (17) wurde dabei die Erwartung geäußert, daß der TBE eines Tumors umso geringer ausfallen könnte, je langsamer er bereits unter Kontrollbedingungen wächst. Experimentell konnten sie dies jedoch für die von ihnen untersuchten Tumoren mit einer Verdopplungszeit von 2 bzw. 10 Tagen nicht bestätigen. Die Wachstumsrate beider Tumoren wurde völlig gleichsinnig durch die Tumorbettvorbestrahlung um einen Faktor von 2,0 reduziert. In gleicher Weise beobachtete Begg (2) die Unabhängigkeit des TBE von der endogenen Wachstumsrate.

4.2 Histogenese des HPM unter verschiedenen Versuchsbedingungen

4.2.1 Überlegungen zur Erstellung von Volumenmodellen aus Flächenschnitten

Zur Analyse von verschiedenen Gewebskomponenten eines Tumors lassen sich zwei Verfahren heranziehen: Die von Chalkley (5) vertretene Punktauswertung bietet sich dabei vor allem bei einer zufälligen Verteilung einzelner Gewebsanteile bzw. einer regelmäßigen Wiederholung kleinster Strukturen an. Eine weitere Möglichkeit der Morphometrie stellt die systematische Flächenausmessung dar, die sich besonders für eine Analyse gut differenzierbarer und in größeren Arealen angeordneter Gewebsanteile eignet. In dieser Arbeit wurde wegen der klaren Unterscheidbarkeit von vitalen und nekrotischen Tumoranteilen im HPM dieses letztere Verfahren vorgezogen.

Morphometrische Untersuchungen werden häufig an Flächenschnitten eines Tumors durchgeführt. Will man jedoch die einzelnen Gewebskomponenten auf den Gesamttumor beziehen, müssen die entsprechenden Volumenanteile bekannt sein. Diese können nur bei einer völlig zufälligen Verteilung nach dem Prinzip von Delèsse direkt aus einem Flächenschnitt übernommen werden. In Tumoren ist diese Bedingung jedoch selten von vornherein gegeben. So stand im HPM die zentrale Häufung der Nekrose einer direkten Übernahme der ermittelten Flächenanteile entgegen. Ausgehend von äquatorialen Schnittpräparaten von Tumoren unterschiedlicher Versuchsgruppen wurden deshalb die drei im folgenden erläuterten Modelle für die Umrechnung von Flächenanteilen in Volumenanteile an Nekrose erstellt:

Modell I: Die Nekrose ist im Tumor zufällig verteilt:
Volumenanteil = Flächenanteil

Modell II: Die Nekrose wird als zentrale kugelförmige Masse deponiert:
Volumenanteil = (Flächenanteil) $^{3}/_{2}$

Modell III: Die Nekrose liegt annähernd zu gleichen Teilen zufällig verteilt und als zentrale Ablagerung vor:
Volumenanteil = Mittelwert aus Volumenanteilen nach Modell I und II

Die Validität dieser Modelle wurde anhand von Stufenschnitten mit Schnittabständen von 150 bis 300 μ an insgesamt 9 Tumoren unterschiedlicher Versuchsgruppen überprüft. Dazu wurde zunächst aus zwei benachbarten äquatorialen Schnittebenen der Flächenanteil an Nekrose ermittelt. Dieser Wert wurde dann nach den Modellen I bis III in Volumenanteile hochgerechnet. Die Ergebnisse wurden schließlich mit dem tatsächlichen Wert des Volumenanteils aus sämtlichen Stufenschnitten verglichen (Tab. 25).

Die Ergebnisse dieses Verfahrens lassen einen deutlichen, von der Vorgeschichte des Tumors unabhängigen Trend erkennen: Nur für Tumoren im subklinischen Bereich kann man von einer zentralen Häufung der Nekrose ausgehen. Sie kommt vor allem durch den beschriebenen Untergang vitalen Gewebes im Zentrum eines Tumortransplantats zustande. Bereits ab 10 mg Tumorgewicht trifft die Annahme einer mehr zufälligen Verteilung der Nekrose die tatsächlichen Verhältnisse besser als Kugelmodelle. Für die Auswertung morphometrischer Untersuchungen in dieser Arbeit wurde deshalb die Umrechnung der Flächenanteile bis zu einem Tumorgewicht von 10 mg nach Modell III durchgeführt, bei allen größeren Tumoren aber wurden Flächen- und Volumenanteile gleichgesetzt (Modell I).

Die Treffsicherheit der Morphometrie aus äquatorialen Tumorschnitten ist diesen Überlegungen zufolge also beachtlich. Dennoch darf eine Reihe von Faktoren, die als Ungenauigkeiten eingehen,

Versuchsgruppe	Tumorgewicht (mg)	Flächenanteil Nekrose	Volumenanteil Nekrose nach			Volumenanteil Nekrose im Stufenschnitt
			Modell I	Modell II	Modell III	
unbeh. HPM / unbeh. Tumorbett	2,5	63,06 %	63,06 %	50,08 %	56,67 %	53,23 %
	140,0	22,54 %	22,54 %	10,70 %	16,62 %	22,29 %
rezid. HPM / unbeh. Tumorbett	6,0	56,64 %	56,64 %	42,63 %	49,64 %	44,02 %
	11,5	17,44 %	17,44 %	7,28 %	12,36 %	20,24 %
	60,0	13,91 %	13,91 %	5,19 %	9,55 %	21,30 %
	100,0	18,94 %	18,94 %	8,24 %	13,59 %	19,54 %
unbeh. HPM / vorbestr. Tumorbett (Intervall 76 Tage)	4,5	36,15 %	36,15 %	21,74 %	28,95 %	28,19 %
	37,0	64,65 %	64,65 %	51,98 %	58,32 %	63,68 %
	132,0	67,40 %	67,40 %	55,34 %	61,37 %	66,45 %

Tab. 25: Prozentanteile an Nekrose für Tumoren verschiedener Größenklassen und Versuchsgruppen: Vergleich der Volumenanteile nach Berechnung aus den Modellen I bis III (siehe Text 4.2.1) mit dem aus Stufenschnitten ermittelten Wert. Das für den jeweiligen Tumor zutreffende Modell ist unterstrichen.

nicht vernachlässigt werden: Sie sind teilweise methodisch bedingt und betreffen dabei die Zufälligkeit der gerade ausgewählten Schnitte - auch in Stufenschnitten, wenn die Abstände nicht sehr eng gestaffelt werden - sowie die Genauigkeit der beschriebenen Verfahren. Ebenso kann aber auch die Komplexheit einer Tumorstruktur in Modellen nur unvollständig erfaßt werden. So wird ein Tumor kaum jemals eine geometrisch einfache Gestalt - vielleicht mit Ausnahme von Metastasen - einnehmen. Dies gilt im untersuchten System bereits für unbehandelte Kontrollen, besonders aber auch für im vorbestrahlten Tumorbett wachsende Tumoren, die wie beschrieben zu einem mehr flächigen Wachstum neigten und wechselnde Verteilungsmuster vitaler Knoten aufwiesen. Gerte (14) erstellte für das in situ rezidivierende HPM von 500 mg verschiedene komplexere Modelle, kam aber letztlich zu ähnlichen Ergebnissen, wie sie durch das vorliegende Material nahegelegt werden. Die komplizierte Morphologie eines Tumors läßt es angebracht erscheinen, sie vereinfachend zu beschreiben und auf eine zu detailreiche Konstruktion unter Zuhilfenahme morphogenetischer Annahmen zu verzichten.

4.2.2 Überlegungen zur Proliferationskinetik des HPM unter verschiedenen Versuchsbedingungen

Das in Abhängigkeit von den Tumorbettbedingungen unterschiedliche Wachstumsverhalten des HPM konnte in den Histogeneseversuchen durch Veränderungen der Gewebsanteile von Nekrose und vitalem Gewebe charakterisiert werden. Die nekrotische Tumorfraktion nahm früher und erheblich stärker zu, wenn das HPM in ein vorbestrahltes Tumorbett transplantiert wurde. Eine umfassende Beschreibung der Wachstumsdynamik und des Proliferationsverhaltens dieses Tumors erfordert deshalb eine Berücksichtigung der wechselnden Gewebs-

zusammensetzung. Ein entsprechendes Modell, das allerdings noch stärker vereinfachende Annahmen enthielt, wurde bereits von Gerte (14) für das rezidivierende HPM nach Bestrahlung in situ sowie für unbehandelte Kontrolltumoren jeweils bei einer Tumorgröße von 500 mg erstellt.

Im folgenden soll nun versucht werden, mit den für den gesamten Wachstumsbereich zu Verfügung stehenden Daten das Proliferationsverhalten des HPM in ein Konzept von Zellflüssen in und aus verschiedenen Tumorkompartimenten einzuordnen. Dazu wird aus einem Vergleich der Zellproduktion mit den Wachstumsraten der beiden Tumoranteile 'Vitales Gewebe' und 'Nekrose' eine differentielle Bestimmung der Größe des Zellverlusts durchgeführt. Der Begriff des Zellverlusts wurde von Steel (48) geprägt und dabei gedanklich Tumoren mit einer einheitlichen Zellpopulation zugewiesen. In Anlehnung an die von Steel erstellte Ableitung wird hier der Versuch einer erweiterten Betrachtung unternommen.

Eine direkte Anwendbarkeit der Steel'schen Formeln trifft dabei für das vitale Tumorkompartiment zu. Aus dem Markierungsindex L. I. sowie der Dauer der S-Phase (T_S) in der proliferierenden Population läßt sich formal eine potentielle Verdopplungszeit vitalen Gewebes ($=T_{pot\ vital}$) beschreiben:

(1) $$T_{pot\ vital} = \lambda \cdot \frac{T_S}{LI}$$

Für das unbehandelte HPM wurde mittels der Markierte-Mitosen-Technik die Dauer der S-Phase von Gerte mit ca. 9 Stunden bestimmt (14). Der Korrekturfaktor λ berücksichtigt die Altersverteilung einer Zellpopulation und damit die Lage der S-Phase innerhalb des Zellzyklus, wobei gilt $\ln 2 < \lambda < 2 \ln 2$. Für experimentelle Mäusetumoren kann dabei λ allgemein mit 0,8 angesetzt werden.

Zwischen dieser potentiellen und der tatsächlichen Verdopplungszeit des vitalen Gewebes wird jedoch stets eine Diskrepanz beobachtet. Diese Diskrepanz hat zur Definition des Zellverlustfaktors ϕ geführt, der den Zellverlust formal als einen Anteil der Zellproduktion beschreibt, der nicht in das Volumenwachstum eingeht. Die tatsächliche Volumenwachstumsrate ergibt sich deshalb als jene Fraktion der potentiellen Wachstumsrate, die nach Abzug des Zellverlustanteils verbleibt:

(2) $$\frac{\ln 2}{T_{D\ vital}} = \frac{\ln 2}{T_{pot\ vital}} \cdot (1 - \phi)$$

Durch Umstellung von (2) bestimmt sich damit der Zellverlustfaktor ϕ als:

(3) $$\phi = 1 - \frac{T_{pot\ vital}}{T_{D\ vital}}$$

Die Erstellung von separaten Wachstumskurven für den nekrotischen und vitalen Gewebsanteil des HPM erlaubte dabei in dieser Arbeit eine direkte Abschätzung der Verdopplungszeit vitalen Gewebes und damit zunächst eine Berechnung von ϕ speziell für dieses Kompartiment.

Die Feststellung eines Zellverlusts für einen Tumor ermöglicht jedoch keine Aussage über den Verbleib dieses Anteils der Zellproduktion. Grundsätzlich lassen sich dabei zwei Hauptkanäle des Zellflusses als Mediatoren des Zellverlusts vorstellen. Ein Teil wird dabei direkt aus dem Tumorvolumen entfernt werden, wobei Mechanismen der Ausschwemmung und des Auftretens von Mikronekrosen mit nachfolgender Resorption wirksam werden. Auskunft über die Größe dieses Anteils erhält man, wenn man in Analogie zum vitalen Kompartiment die tatsächliche Wachstumsrate des Gesamttumors mit seiner potentiellen Wachstumsrate vergleicht. Diese $T_{pot\ Tumor}$ ergibt sich, wenn man sich das proli-

ferierende Gewebe über den Gesamttumor verteilt vorstellt und die potentielle Verdopplungszeit vitalen Gewebes ($T_{pot\ vital}$) entsprechend korrigiert:

(4) $$T_{pot\ Tumor} = \frac{T_{pot\ vital}}{\text{Vitale Fraktion}}$$

Damit läßt sich in Analogie zu (2) und (3) der Zellverlustfaktor für den Gesamttumor als ϕ_{Tumor} ableiten:

(5) $$\frac{\ln 2}{T_{D\ Tumor}} = \frac{\ln 2}{T_{pot\ Tumor}} \cdot (1 - \phi_{Tumor})$$

(6) $$\phi_{Tumor} = 1 - \frac{T_{pot\ Tumor}}{T_{D\ Tumor}}$$

Die beobachtete Zunahme der Nekrose setzt jedoch einen weiteren Anteil des Zellverlusts voraus, der im Tumor verbleibt und die Nekrose speist. Aus der Zellverlustrate des vitalen Kompartiments wird dazu ein Teilfluß abgezweigt, der die Größenzunahme der Nekrose bewirkt und durch einen Verlustfaktor $\phi_{Nekrose}$ beschrieben werden kann. Dieser Sachverhalt wird durch die Gleichungen (7) und (8) beschrieben. Der Anteil vitalen Gewebes wird dabei als vitale Fraktion ($F_{vit.}$), der Nekroseanteil als nekrotische Fraktion ($F_{Nekr.}$) angegeben:

(7) $$\frac{\ln 2}{T_{pot\ vital}} \cdot F_{vit.} \cdot \phi_{Nekrose} = \frac{\ln 2}{T_{D\ Nekrose}} \cdot F_{Nekr.}$$

(8) $$\phi_{Nekrose} = \frac{F_{Nekr.}}{F_{vit.}} \cdot \frac{T_{pot\ vital}}{T_{D\ Nekrose}}$$

In den Tabellen 26 und 27 sind die experimentell bestimmten Parameter L.I., $T_{D\ Tumor}$, $T_{D\ vital}$, $T_{D\ Nekrose}$, vitale und nekrotische Fraktion und die nach den Gleichungen (1) bis (8) berechneten Proliferationsgrößen und Zellverlustfaktoren für die einzelnen Versuchsbedingungen in Abhängigkeit von der Tumorgröße aufgelistet. Die geringste Abhängigkeit von den Versuchsbedingungen

Versuchs-gruppe	Tumor-gewicht (mg)	LI	$F_{vit.}$	$F_{Nekr.}$	T_D Tumor (h)	T_D vital (h)	T_D Nekrose (h)	T_{pot} vital (h)	T_{pot} Tumor (h)	ϕ	ϕ Tumor	ϕ Nekrose
unbeh. HPM / unbeh. Tumor-bett	10	0,21	0,96	0,04	43,2	38,4	72,0	34,3	35,7	0,10	0,17	0,02
	30	0,22	0,93	0,07	72,0	60,0	67,2	32,7	35,2	0,45	0,51	0,04
	50	0,21	0,85	0,15	76,8	74,4	62,4	34,3	40,4	0,54	0,47	0,09
	100	0,21	0,76	0,24	91,2	134,4	67,2	34,3	45,1	0,74	0,51	0,16
	300	0,19	0,67	0,33	139,2	153,6	96,0	37,9	56,6	0,75	0,59	0,19
	500	0,17	0,61	0,39	172,8	204,0	139,2	42,4	69,5	0,79	0,59	0,19
rezid. HPM / unbeh. Tumor-bett	10	0,19	0,79	0,21	48,0	48,0	67,2	37,9	48,0	0,21	0,01	0,15
	30	0,19	0,77	0,23	60,0	55,2	50,4	37,9	49,2	0,31	0,18	0,22
	50	0,18	0,75	0,25	67,2	57,6	50,4	40,0	53,3	0,31	0,21	0,26
	100	0,17	0,68	0,32	96,0	84,0	67,2	42,4	62,4	0,49	0,35	0,29
	300	0,16	0,59	0,41	163,2	220,8	156,0	45,0	76,3	0,79	0,53	0,20
	500	0,14	0,58	0,42	172,8	276,0	160,8	51,4	88,6	0,81	0,49	0,24

Tab. 26: Direkt bestimmte und berechnete wachstumskinetische Parameter für Tumoren im unbehandelten Tumorbett

Versuchs-gruppe	Tumor-gewicht (mg)	LI	$F_{vit.}$	$F_{Nekr.}$	T_D Tumor (h)	T_D vital (h)	T_D Nekrose (h)	T_{pot} vital (h)	T_{pot} Tumor (h)	ϕ	ϕ Tumor	ϕ Nekrose
unbeh. HPM / vorbestr. Tumor-bett (Intervall 76 Tage)	10	0,19	0,77	0,23	76,8	76,8	81,6	40,0	51,9	0,48	0,32	0,15
	15	0,17	0,67	0,33	163,2	225,6	124,8	42,4	63,3	0,81	0,62	0,17
	30	0,16	0,46	0,54	158,4	211,2	134,4	45,0	97,8	0,79	0,38	0,39
	50	0,16	0,39	0,61	148,8	211,2	144,0	45,0	115,4	0,78	0,23	0,48
	100	0,16	0,31	0,69	163,2	201,6	153,6	45,0	145,2	0,78	0,11	0,65
	300	0,15	0,31	0,69	220,8	201,6	211,2	46,5	150,0	0,77	0,31	0,49
	500	0,15	0,31	0,69	220,8	216,0	220,8	46,5	150,0	0,79	0,32	0,47
unbeh. HPM / vorbestr. Tumor-bett (Intervall 175 Tage)	15	0,22	0,95	0,05	160,8	180,0	55,2	32,7	34,4	0,82	0,79	0,03
	30	0,22	0,83	0,17	156,0	187,2	52,8	32,7	39,4	0,83	0,75	0,12
	50	0,21	0,63	0,37	120,0	163,2	60,0	34,3	54,4	0,80	0,55	0,33
	100	0,18	0,55	0,45	115,2	151,2	67,2	40,0	72,7	0,74	0,37	0,48
	300	0,15	0,47	0,53	139,2	165,6	103,2	48,0	102,1	0,71	0,27	0,51
	500	0,15	0,44	0,56	172,8	192,0	124,8	48,0	109,1	0,75	0,37	0,46

Tab. 27: Direkt bestimmte und berechnete wachstumskinetische Parameter für Tumoren im vorbestrahlten Tumorbett (Intervalle 76 und 175 Tage)

ergibt sich dabei für die $T_{pot\ vital}$, die entsprechend der gemessenen Markierungsindizes nur zwischen 32,7 und 51,4 Stunden schwankt. Alle anderen Parameter unterliegen dem Einfluß der Tumorbettbedingungen und werden entsprechend getrennt besprochen:

Für Tumoren im unbehandelten Tumorbett gilt, daß der Zellverlustfaktor für das vitale Gewebe kontinuierlich mit der Tumorgröße ansteigt und ein Maximum von 0,79 im unbehandelten HPM bzw. von 0,81 im Rezidivtransplantat bei einem Tumorgewicht von 500 mg erreicht. Im bestrahlten Tumorbett tritt der maximale Zellverlust bereits zu Beginn des klinischen Wachstums bei einem Tumorgewicht von 15 mg auf und beträgt bereits in diesem Wachstumsstadium 0,81 (Intervall 76 Tage) bzw. 0,82 (Intervall 175 Tage). Im weiteren Wachstumsverlauf bleibt diese Größe für beide Versuchsgruppen unverändert hoch.

Betrachtet man die Aufschlüsselung des Zellverlusts in einen Teilfluß aus dem Tumor und einen Teilfluß in die Nekrose, so überwiegt im unbehandelten HPM im unbehandelten Tumorbett für alle Tumorgrößen der Verlust aus dem Tumorvolumen. Mit zunehmender Größe deponieren diese Tumoren einen wachsenden Anteil der Zellproduktion in die Nekrose, der schließlich bei 500 mg 20 % der Produktionsrate beträgt. Dieser Anteil entspricht dabei ca. 25 % des Verlusts aus dem vitalen Gewebe. Rezidivtransplantate wiesen wie beschrieben bis 50 mg in einzelnen Tumoren des Histogeneseversuchs eine zentrale Häufung der Nekrose auf und fielen deshalb mit ihrem Nekroseanteil nicht unter 21 % des Gesamttumors. Entsprechend überwiegt bis zu dieser Tumorgröße noch ein Zellverlust in die Nekrose. Im weiteren Verlauf nähert sich die Aufteilung der Zellflüsse dem unbehandelten HPM an. Bei 500 mg entfallen auf den Verlust aus dem Volumen 49 % der Zellproduktion bzw. 66 % des Gesamtverlusts, während 24 % der Pro-

duktion bzw. 33 % des Gesamtverlusts in die Nekrose eingehen.

Nach Tumorbettvorbestrahlung erfolgt ein deutlich höherer Anteil des Zellverlusts in die Nekrose. Für das 175 Tage-Intervall erreicht dieser Teilfaktor ein Maximum von 70 % des Gesamtverlusts bei 300 mg. Beim 76 Tage-Intervall verschiebt sich dieser Vorgang nach niedrigeren Tumorgewichten: Bereits ab 30 mg überwiegt der Verlust in die Nekrose, ein maximaler Teilfluß wird bei 100 mg mit 83 % des Gesamtverlusts erreicht. Oberhalb dieser Maxima nähert sich die Aufteilung in beiden Gruppen wieder etwas den Kontrolltumoren an, ohne sie jedoch zu erreichen.

Für die einzelnen Komponenten des Zellverlusts gilt dabei die theoretische Forderung, daß ihre Summe gleich dem Verlust aus dem vitalen Gewebe als Ort der Zellproduktion sein muß:

$$(9) \qquad \phi = \phi_{\text{Tumor}} + \phi_{\text{Nekrose}}$$

Bei Betrachtung der einzelnen Zellverlustfaktoren in den Tabellen 26 und 27 fällt jedoch auf, daß ihre Summe nie exakt den Gesamtverlust erreicht, sondern ihn in nicht systematischer Weise teils unter-, teils überschreitet. Dieses Verhalten erklärt sich daraus, daß der Berechnung der einzelnen Faktoren graphisch abgegriffene Verdopplungszeiten aus Histogenesekurven zugrundeliegen, die mit dem Auge an die Meßpunkte angepaßt werden.

Ersetzt man nämlich in Gleichung (9) die einzelnen Faktoren durch ihre Bestimmungsgleichungen, so erhält man:

$$(10) \qquad 1 - \frac{T_{\text{pot vital}}}{T_{\text{D vital}}} = 1 - \frac{T_{\text{pot vital}}}{F_{\text{vit.}} \cdot T_{\text{D Tumor}}} + \frac{F_{\text{Nekr.}}}{F_{\text{vit.}}} \cdot \frac{T_{\text{pot vital}}}{T_{\text{D Nekrose}}} ,$$

durch Multiplikation mit $\frac{1}{T_{\text{pot vital}}}$:

$$(11) \qquad \frac{1}{T_{\text{D vital}}} = \frac{1}{F_{\text{vit.}} \cdot T_{\text{D Tumor}}} - \frac{F_{\text{Nekr.}}}{F_{\text{vit.}}} \cdot \frac{1}{T_{\text{D Nekrose}}} ,$$

durch weitere Multiplikation mit $F_{vit.}$:

$$(12)\quad \frac{F_{vit}}{T_{D\ vital}} = \frac{1}{T_{D\ Tumor}} - \frac{F_{Nekr.}}{T_{D\ Nekrose}} ,$$

und schließlich durch Umstellung die Gleichung

$$(13)\quad \frac{1}{T_{D\ Tumor}} = \frac{F_{Nekr.}}{T_{D\ Nekrose}} + \frac{F_{vit.}}{T_{D\ vital}} .$$

Gleichung (13) beschreibt die Wachstumsrate des Gesamttumors als Summe der volumetrisch gewichteten Wachstumsraten seiner Gewebsanteile und damit die Bedingung, die erfüllt sein muß, damit ϕ exakt durch die Summe aus ϕ_{Tumor} und $\phi_{Nekrose}$ beschrieben wird. Eine bessere Übereinstimmung der Einzelkomponenten mit dem Gesamtzellverlust ist deshalb nur zu erwarten, wenn die Optimierung der Kurven (d.h. die Minimierung der Abweichungen von den Meßpunkten) unter Berücksichtigung der Gleichung (13) im Kurvenverlauf erfolgt.

Neben diesen methodisch bedingten Ungenauigkeiten vernachlässigt das vorgestellte Modell auch eine Volumenreduktion in Verbindung mit der Nekrotisierung sowie die nicht auszuschließende partielle Resorption nekrotischer Massen. Trotz dieser Einschränkungen erscheinen jedoch die simultane Anwendung verschiedener Meßmethoden und das Berechungsmodell geeignet, in einer ersten Annäherung die Wachstumsdynamik eines Tumors unter Berücksichtigung seiner geweblichen Zusammensetzung zu beschreiben. Diese Bearbeitung der Daten aus den Histogeneseversuchen lieferte somit eine Darstellung des TBE auf der Ebene geweblichen Wachstums.

4.3 Pathologie und Pathogenese des Tumorbetteffekts

4.3.1 Strahlenschäden der Tumorbettvaskulatur als Ursache des TBE

Die Untersuchungen dieser Arbeit demonstrieren die Existenz eines ausgeprägten TBE für das HPM der NMRI-Maus. Dies äußerte sich funktionell in einer Verlangsamung der Wachstumsrate, morphometrisch in einer Verdopplung der Nekroseanteile der im bestrahlten Tumorbett wachsenden Tumoren und wachstumskinetisch in einem über den gesamten Beobachtungsbereich bestehenden hohen Zellverlustfaktor von 0,8. Diese kausal verknüpfbaren Beobachtungen können pathogenetisch als Ausdruck einer im bestrahlten Tumorbett limitierten Versorgung durch das vom Wirt gestellte Stroma interpretiert werden. Die eigentliche Tumorzellpopulation jedoch ist ungeschädigt und zu praktisch normaler Proliferation fähig, wie aus der im vitalen Gewebe gemessenen Proliferationsrate gefolgert werden kann.

Unterstützt wird diese Interpretation durch Untersuchung von Jirtle, Clifton et. al. (6, 23). Sie konnten ebenfalls eine normale Proliferation im vitalen Gewebe von Tumoren nachweisen, die in ihrem Volumenwachstum einem TBE unterlagen. Dies konnte mit dem Befund korreliert werden, daß im vitalen Gewebe ein nahezu normales Verhältnis zwischen Gefäßvolumen und versorgtem Tumorparenchym besteht, die Durchblutung des Gesamttumors im vorbestrahlten Situs jedoch auf ca. 50 % reduziert ist.

Auf Grund dieser und der eigenen Befunde kann deshalb die vom Tumorbett gebildete Vaskulatur als Mediator des TBE angenommen werden. So finden Takahashi und Kallman (52) beispielsweise in dem als Tumorbett fungierenden subkutanen Gewebe der Maus 12 Wochen nach Bestrahlung mit Dosen von 20 bis 40 Gy einer 250 kV Röntgenstrahlung eine starke Reduktion der Gefäßaustauschfläche

pro Volumeneinheit Gewebe, einer Größe, die als entscheidend für die Versorgung des abhängigen Gewebes mit Sauerstoff und Metaboliten gilt. Sie verknüpfen diesen Befund mit der Pathophysiologie des TBE und schlagen vor, den TBE als kombinierten Effekt einer reduzierten Kapazität zur Neovaskularisation, strahleninduzierter Veränderungen existenter Gefäße sowie einer Beeinflussung der Vaskulatur durch die Strahlenfibrose des Bindegewebes zu sehen.

Diese einzelnen Komponenten der Strahlenwirkung auf die Vaskulatur wurden von zahlreichen Autoren untersucht. Die wichtigsten Arbeiten hierzu werden in den nächsten Abschnitten vorgestellt, ihre Bedeutung für die Histogenese und den Zeitverlauf des TBE wird dann in den folgenden Kapiteln besprochen. Von Merwin und Hill (33) sowie van den Brenk (61) wurde nach Röntgenbestrahlung mit Dosen bis zu 20 Gy ein reduziertes und qualitativ verändertes Wachstum von Kapillarsprossen nach Stimulation durch experimentelle Traumatisierung nachgewiesen. 20 Gy stellen dabei nach van den Brenk eine Art Sättigungsdosis dar, mit der eine vollständige Hemmung der Neovaskularisation durch Bildung einer fibrösen Sperrschicht aus Fibroblasten und einer 'Prokollagen-Matrix' erreicht wird. Als Zeichen einer starken Erholungsfähigkeit bestrahlter Endothelien wertete er dabei die Beobachtung, daß ein erneuter Stimulus zu einer Hyperregeneration dieser gehemmten Kapillaren führen kann und diese mit einer Geschwindigkeit aussprossen, wie sie auch unbestrahlte Kapillaren zeigen.

Sowohl von van den Brenk et. al. (62) als auch von Reinhold und Buisman (40) konnte diese Erholungsfähigkeit bestrahlter Endothelien in Untersuchungen zur Dosisabhängigkeit der Endothelzellinaktivierung am subkutanen Gewebe der Ratte mittels der Taschentechnik bestätigt werden. So fanden die letztgenannten Autoren eine Änderung der zellulären Strahlenempfindlichkeit in Abhängig-

keit vom Intervall zwischen Bestrahlung und Stimulation. Während die D_0 bei unmittelbar an die Bestrahlung anschließender Stimulation bei 1,68 Gy lag, stieg sie auf 2,37 Gy bei Stimulation nach 16 Tagen und auf 2,73 Gy nach 32 Tagen. In der Überlebenskurve konnte parallel dazu eine Zunahme der Schulter festgestellt werden. Die Autoren folgerten deshalb die Existenz zweier Repairmechanismen für Kapillarendothelien, wobei einer typischen Elkind-Erholung ein ausgeprägter Mechanismus einer langsamen Erholung gegenübersteht.

Handelt es sich hierbei um isolierte Strahlenwirkungen auf Endothelzellen, so fand Hopewell (21) nach Dosen von 20 bis 30 Gy eine Reduktion des Blutvolumens in der bestrahlten Hamsterbackentasche über einen Zeitraum von 2 Monaten bis zu einem Jahr nach Bestrahlung. Zusammen mit Young (22) stellte er später als Erklärung Gefäßkonstriktionen und -obliterationen durch klonale Endothelzellproliferation in den Vordergrund, die sich als Antwort auf einen initialen strahlenbedingten Zellverlust ausbilden. Das Auftreten solcher Konstriktionen konnten die Autoren mit minimalen Durchblutungsraten in der Schweinehaut 3 Monate nach Bestrahlung, im Rattengehirn 6 Monate nach Bestrahlung sowie mit den zitierten Befunden an der Hamsterbackentasche korrelieren. Hirst et. al. (19) beobachteten zwischen 3 und 9 Monaten nach Bestrahlung einer vorgelagerten Mesenterialschlinge der Maus mit Dosen von 20 bis 45 Gy ein reduziertes Gefäßvolumen der Mesenterialgefäße. Im Gegensatz zu einer überschießenden Endothelzellproliferation fanden sie jedoch gleichzeitig einen Verlust der Endothelzellauskleidung in den bestrahlten Arteriolen (20). Pathologisch-anatomisch beschrieb Zollinger (69) neben typischen Kapillarschäden wie Endothelzellnekrosen nach Bestrahlung auch eine Insudation der Intima von Arteriolen und Arterien mit nachfolgender Lumeneinengung über eine Zeit von 2 Wochen bis 8 Monate nach Bestrahlung und be-

tonte gleichzeitige die potenzierende Rolle zusätzlicher pathologischer Stimuli auf die Manifestation solcher Schäden.

Eine Fibrosklerose des subkutanen Bindegewebes konnten Takahashi und Kallman (52) bereits ab der 4. Woche nach Bestrahlung feststellen. In menschlichen Tumoren ist die strahleninduzierte Fibrose (Vernarbung) ein häufiger Befund. In älteren Arbeiten von Jolles und Koller (26) wird dieser Fibrose in Tumorstroma und Tumorbett sogar eine therapieentscheidende Rolle zugesprochen. In ihrer umfassenden Darstellung der klinischen Strahlenpathologie unterstreichen Rubin und Casarett (43) die generelle Bedeutung der Bindegewebsreaktion für die Ausbildung verzögerter und chronischer Strahlenschäden: Danach führen Exsudate infolge strahlenbedingter Gefäßschäden in Verbindung mit einem strahleninduzierten Parenchymverlust zu einer sekundären Reparatur durch Fibroblasten. Die sich ausbildende Fibrose erhöht ihrerseits wieder die Barriere zwischen Gefäßen und zu versorgenden Geweben und bewirkt über diese Minderversorgung eine Selbsterhaltung des Prozesses. Als Endzustand resultiert ein Rückgang von Gefäßdichte und Funktion, wobei der Grad der Schädigung von den Anforderungen zu versorgender Gewebe bestimmt wird. Diese Veränderungen beginnen bereits mit dem Abklingen akuter Strahlenschäden; für das subkutane Bindegewebe der Ratte fällt der Beginn dieser Phase z.B. in einen Zeitraum zwischen 10 und 70 Tagen nach Bestrahlung.

4.3.2 Bedeutung der Schädigungsformen des Tumorbetts für den Wachstumsverlauf

Die beschriebenen Schädigungsformen der Tumorbettvaskulatur werden in Abhängigkeit von der Wachstumsphase transplantierter Tumoren und vom Intervall zwischen Bestrahlung und Manifestation in unterschiedlicher Weise wirksam. Während einige Beobachtungen

durch das Vorherrschen eines einzelnen pathogenetischen Prinzips erklärt werden können, ist die Wachstumsbeeinflussung durch den TBE in der Regel jedoch als Resultat einer Überlagerung verschiedener Mechanismen anzusehen.

Grundsätzlich abzugrenzen ist hiervon der Zeitraum zwischen Transplantation und Vaskularisation des Transplantats. Da Transplantate aller Versuchsgruppen in dieser Phase unter den Bedingungen eines nur durch Diffusion ernährten Sphäroids leben, ist ein wesentlicher Einfluß der Tumorbettvorbestrahlung zu diesem Zeitpunkt nicht zu erwarten. Das Auftreten erster Kapillaren im HPM zwischen dem 3. und 5. Tag nach Transplantation steht im Einklang mit den Untersuchungen über die avaskuläre Phase des Tumorwachstums, wie sie von Knighton (28) für das Walker-Carcinom, von Warren (67) und Goodall (15) für transplantable Melanome berichtet wurde.

Für alle untersuchten Intervalle wurde jedoch darüberhinaus eine Phase kaum behinderten Wachstums zwischen Vaskularisation und meist sehr rasch einsetzender Ausprägung des TBE gefunden. Dieser Wachstumsabschnitt erstreckte sich bis zu einem Tumorgewicht von 10 mg für das 76 Tage- und bis zu 20 mg für das 175 Tage-Intervall der Histogeneseversuche. In den Untersuchungen mit externen Wachstumsmessungen fand sich ein der Normalsituation vergleichbares Wachstum bis zu einem Gewicht von 50 mg und mehr für Intervalle von 3 Stunden und 6 Tagen; ebenso ließ sich die in den Histogeneseversuchen angedeutete Ausdehnung dieses Wachstumsabschnitts zu größeren Tumoren für die späten Intervalle von 185 und 274 Tage bestätigen. Die für die rasche Proliferation dieser Tumoren notwendige Versorgung wird dabei in der Frühphase des Tumorwachstums durch ein System von Kapillaren bewerkstelligt und setzt damit erfolgreiche Teilungen von Endothelzellen im Tumorbett voraus. Wie sich in den Histogenese-

versuchen direkt beobachten und in den übrigen Experimenten aus der Rückextrapolation der Wachstumskurven in den subklinischen Bereich abschätzen läßt, beginnt das Tumorwachstum im vorbestrahlten Tumorbett ähnlich früh wie das der Kontrollen. Damit erscheint aber für diese Tumoren eine Kapillarisierung durch Gefäßsprossen, die von außerhalb des Bestrahlungsfeldes einwachsen, unwahrscheinlich, da die Wachstumsgeschwindigkeit tumorstimulierter Kapillaren nach Folkman (10) nur 0,3 bis 0,6 mm/Tag beträgt. Andererseits aber wird die Überlebensrate der Endothelien des Tumorbetts bei einer Dosis von 30 Gy und einer maximalen D_o von 2,73 Gy (40) auf mindestens 10^{-4} gesenkt. Tannock und Hayashi (55) beschreiben für Endothelien unter maximaler Stimulation eine Turnover-Zeit von 50 bis 60 Stunden. Vergleicht man damit die Dauer der Phase unbehinderter Proliferation im vorbestrahlten Tumorbett für die beiden frühesten Intervalle, die etwa bis zum 15. Tag nach Transplantation anhält, so würde dieser Zeitraum das Durchlaufen von 4 bis 6 Teilungszyklen der Endothelien erlauben. Nach Trott (58) kann sich der letale Strahlenschaden proliferierender Säugerzellen unter Umständen erst nach 3 bis 5 abortiven Teilungen manifestieren. Berücksichtigt man neben dieser Überlegungen zusätzlich den am HPM sowie an anderen Melanomen (Warren (68)) erhobenen Befund, daß die Gefäßversorgung im Tumorgewebe auch durch tumorzellbegrenzte Kanäle unterstützt werden kann, so erscheint der Aufbau eines Gefäßsystems in Tumoren früher Bestrahlungs-Transplantationsintervalle durch bestrahlte, den Strahlenschaden letztendlich nicht überlebende Endothelien durchaus möglich. Tannock (54) stellt weiter fest, daß erst mit dem Auftreten mitosegekoppelter Pyknosen ein kumulativer Effekt durch Stimulation anderer Endothelien und neuerlichem Zelluntergang ausgelöst wird. In gleicher Weise könnte deshalb die Ausprägung eines maximalen TBE in diesen Tumoren als

Folge eines solchen Schneeballeffekts der Endothelzellpopulation interpretiert werden.

Mit zunehmendem Intervall zwischen Bestrahlung und Transplantation drückt sich der TBE im Wachstumsverlauf transplantierter Tumoren früher aus. Legt man die ebenfalls von Tannock (55) bestimmte Turnoverzeit unstimulierter Kapillarendothelien von 8 Wochen zugrunde, so werden mit wachsendem Abstand von der Bestrahlung zunehmend auch unstimulierte Endothelien des Tumorbetts einige Teilungen durchlaufen und damit einen Teil der noch zur Verfügung stehenden abortiven Mitosen vorwegnehmen. Die frühe Ausprägung des TBE in der Zeit zwischen 50 und 150 Tagen nach Bestrahlung könnte deshalb darin begründet sein, daß für diese Endothelien der kumulative Zelluntergang wesentlich früher erfolgt. Auch die Beobachtung, daß sich bei weiterer Verlängerung des Bestrahlungs-Transplantationsintervalls die Phase unbehinderten Tumorwachstums zu größeren Tumorvolumina hin ausweitet, kann mit dem langsamen Umsatz unstimulierter Endothelien erklärt werden, wobei nun ein zunehmender Ersatz untergegangener Zellen durch die Nachkommen überlebender geschaffen wird. Ein vergleichbarer Zeitverlauf der Erholung wurde beispielsweise auch von Hirst (19, 20) für die Endothelzellpopulation bestrahlter Mesenterialgefäße gefunden.

Während der rasche Eintritt der Wachstumsreduktion im bestrahlten Tumorbett in erster Linie durch den akuten Endothelzelluntergang erklärt werden kann, wird diese Schädigungsform mit zunehmendem Wachstum durch andere Mechanismen überlagert. Der manifeste TBE großer Tumoren erreichte bereits ab dem 100. Tag nach Bestrahlung ein Plateau, das über den gesamten Untersuchungszeitraum fortbestand. In gleicher Weise wiesen morphometrisch untersuchte Tumoren aller mittleren und späten Intervalle einen konstant hohen Nekroseanteil von 60 % auf, der keine Tendenz zur Normalisierung im Sinne einer Annäherung der Gewebszusam-

mensetzung an die des Kontrolltumors erkennen ließ. Beide Befunde weisen auf Schäden der Vaskulatur hin, die gegenüber Endothelzellschäden länger fortbestehen bzw. später einsetzen. Die auffällige Anordnung vitalen Gewebes in Form großer Inseln zwischen großflächigen Nekrosearealen weist dabei ebenso wie die Fähigkeit zu einer normalen Proliferation in diesen Inseln eher auf Veränderungen an größeren Gefäßen hin. Diese könnten sowohl in einer verminderten Anzahl und unzureichenden Größe versorgender Gefäße im Sinne einer reduzierten Neovaskularisation als auch in einer funktionellen Beeinträchtigung durch pathologische Prozesse in der Gefäßwand bestehen. Zusätzlich ist hierbei zu bedenken, daß sich alle Veränderungen auf dem Boden einer subkutanen strahleninduzierten Fibrose abspielen, die sich ab dem 3. bis 4. Monat nach Bestrahlung entwickelte und deren Einfluß zumindest in einer mechanischen Alteration und Lumenbeeinflussung bestehender Gefäße wirksam werden dürfte.

4.4 Tumorbetteffekt und Rezidivwachstum in situ

Ein Ziel dieser Arbeit bestand in der Beantwortung der Fragestellung, inwieweit das Wachstum eines rezidivierenden Tumors nach lokaler Bestrahlung durch geeignete TBE-Experimente simuliert werden kann. Den in situ Bedingungen dürfte am ehesten eine Versuchsgruppe entsprechen, in der Rezidivtransplantate zum gleichen Manifestationszeitpunkt wie in situ einer Wachstumsbeeinflussung durch den TBE unterliegen. Eine Retransplantation von Rezidiven wurde jedoch erst ab einem Bestrahlungs-Transplantationsintervall von 54 Tagen durchgeführt. Der identische Zeitverlauf der TBE-Parameter für Rezidivtransplantate mit dem Verhalten unbehandelter HPM im vorbestrahlten Tumorbett gestattet jedoch auch einen Vergleich mit diesen Versuchsgruppen.

Darüberhinaus liefert diese Übereinstimmung des TBE-Verlaufs einen indirekten Hinweis, daß sich die Tumorzellpopulation im Rezidiv in ihrem Proliferationsverhalten nicht wesentlich von dem unbehandelten HPM unterscheidet. Den direkten Beweis hierfür erbrachte die Analyse des Wachstums von Rezidivtransplantaten im unbehandelten Tumorbett. Wachstumsgeschwindigkeit und gewebliche Entwicklung dieser Tumoren zeigten keine Unterschiede zum unbehandelten HPM. Ebenso wiesen die nur geringfügig erniedrigten Markierungsindizes auf eine nahezu normale Proliferation der überlebenden Zellen im rezidivierenden HPM hin. Eine von Gerte (14) durchgeführte detaillierte Bestimmung der Zellzyklusparameter im HPM-Rezidiv (Tumorgröße 500 mg) ergab zwar eine geringe Verlängerung der Zellzykluszeit von 16,4 auf 21,9 Stunden gegenüber Kontrolltumoren, jedoch eine vergleichbar lange potentielle Verdopplungszeit. Von Nelson (35) wurde für ein C3H-Mammacarcinom eine identische Zellzykluszeit von Lokalrezidiven und unbestrahlten Kontrollen berichtet. Im übrigen fanden auch Tenforde (56), Nelson (34) und Begg (2) für verschiedene experimentelle Tumoren nach Bestrahlung, Peel (39) nach zytostatischer Therapie ein Kontrolltumoren vergleichbares Wachstum, wenn sie Lokalrezidive in unbestrahlte Gewebe retransplantierten.

Das Wachstum von Rezidivtransplantaten war allerdings zusätzlich durch eine Wachstumslatenz von 12 bis 13 Tagen gegenüber unbehandelten HPM charakterisiert. Eine Erklärung dieser Latenz könnte die verminderte Ausstattung der Transplantate mit klonogenen Zellen liefern. Ihr Anteil würde dann bei der Annahme einer Verdopplungszeit von 2,0 Tagen und einer Latenz von 12 Tagen 2^{-6}, d.h. ca. 1,6 % gegenüber unbehandelten Transplantaten betragen. Die Beobachtung, daß Rezidivtransplantate aus makroskopisch vitalen Tumorbezirken im Durchschnitt einen höheren Nekroseanteil aufweisen, kann dabei im Sinne dieser Verminderung interpretiert werden. Andererseits geht in diese Latenz auch der

Befund ein, daß einzelne Transplantate bis zum 24. Tag nach Bestrahlung noch immer in einem avaskulären Zustand vorlagen. Hierbei könnte es sich um eine verminderte Fähigkeit zur Angiogeneseinduktion, vielleicht als Ausdruck eines spezifischen Restschadens handeln. Dieses durch die Retransplantation erzeugte Phänomen dürfte allerdings für die Situation des Rezidivwachstums in situ mit einem bereits voll ausgebildeten Gefäßnetz eine untergeordnete Rolle spielen.

Vergleicht man nun die Wachstumskurve des rezidivierenden HPM in situ mit dem Wachstumsverlauf im vorbestrahlten Tumorbett nach Bestrahlungs-Transplantationsintervallen von 3 Stunden bzw. 6 Tagen, so findet sich eine völlige Übereinstimmung der Wachstumsrate und des Manifestationszeitpunkts für die Phase des späten Rezidivwachstums (Abb. 31). Quantitativ liegt der gemessene $SR_{250/500\ mg}$ für Rezidive in situ von 3,67 genau zwischen den

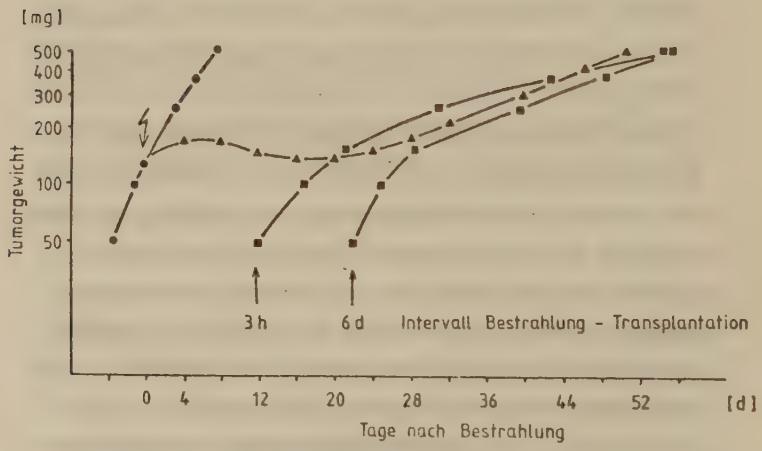


Abb. 31: Wachstum des HPM nach Bestrahlung in situ (30 Gy/ 300 kV) (▲) bzw. nach Transplantation eines unbehandelten Tumors in ein vorbestrahltes Tumorbett (30 Gy/ 300 kV) (■). Auf der Abszisse ist die absolute Zeit nach Bestrahlung aufgetragen.

Werten dieser Intervalle. Überträgt man diese formale Übereinstimmung auf die Pathogenese des Rezidivwachstums in dieser Phase, so wäre sie allein durch den TBE erklärbar.

Die Volumenwachstumskurve des HPM nach Bestrahlung läßt jedoch bis zum Eintritt des retardierten Wachstums keine Rückschlüsse auf das Verhalten der überlebenden Zellpopulation zu. Wie in anderen nicht schrumpfenden Tumorsystemen wird ihr Wachstum durch nicht abgebaute Nekrosemassen überdeckt. Ein Anhalt über das Verhalten dieser überlebenden Zellen läßt sich jedoch aus der Abschätzung der Überlebensrate gewinnen: Nach Kummermehr (29) kann für das HPM eine ähnliche Abhängigkeit der Tumorheilung von der Strahlendosis wie für andere experimentelle Tumorsysteme angenommen werden. Überlebenskurven von Melanomzellen in vitro nach Bestrahlung (Barranco (1), Dewey (9), Trott (59)) ergaben eine zelluläre Strahlenempfindlichkeit, die ebenfalls innerhalb des von anderen Tumoren bekannten Bereichs lag. Dies würde für die Einzeitbestrahlung mit 30 Gy unter Berücksichtigung der strahlenresistenten hypoxischen Fraktion eine Abnahme der Überlebensrate klonogener Zellen auf mindestens 10^{-4} bedeuten. Da der rezidivierende Tumor das Bestrahlungsgewicht zwischen dem 20. und 28. Tag nach Bestrahlung wieder überschreitet, sind für dieses Wachstum selbst bei einem Anteil vitalen Gewebes von nur 30 % 11 bis 12 Verdopplungen jeweils aller teilungsfähigen überlebenden Zellen notwendig. Dies würde aber ein praktisch unbehindertes Wachstum, damit aber auch eine optimale vaskuläre Versorgung in dieser Phase erfordern.

Legt diese Betrachtung eine Übernahme der pathogenetischen Überlegungen zum TBE auch für das frühe Wachstum des rezidivierenden Tumors nahe, so wird andererseits gerade dieser Zeitraum vom experimentellen Modell unzureichend simuliert. Denn während in den TBE-Versuchen die Bestrahlung jeweils ein ruhendes

Tumorbett trifft, ist für die in situ Bestrahlung die Schädigung eines maximal stimulierten Stromas zu erwarten. Entsprechend sollte dessen Strahlenschaden in situ sehr früh nach Bestrahlung manifest werden und mit nur geringer zeitlicher Verzögerung der Inaktivierung von Tumorzellen folgen.

Die für das bestrahlte Tumorbett angenommene Zahl noch abrufbarer abortiver Endothelzellteilungen wäre demnach aber für die Endothelzellen des Rezidivs nicht mehr vorhanden. Andererseits läßt es die nach Bestrahlung nur noch geringfügig erfolgende Volumenzunahme des Tumors möglich erscheinen, daß mit Eintritt der Strahlenwirkung auf die Tumorzellen die Endothelzellstimulation erlischt und ein größerer Teil bestrahlter Endothelien keine weiteren Teilungen mehr durchläuft. Thomlinson (57) sowie Merwin (32) beschrieben nach Eintritt des Wiederwachstums rezidivierender Tumoren eine zweite Phase der Wachstumsverlangsamung und konnten diese histologisch mit Kapillardegenerationen und -thrombosen im Tumor korrelieren. Diese Befunde sind aber in gleicher Weise nur durch einen zum Großteil latent bleibenden und erst bei Überschreiten der Bestrahlungsgröße ausgebildeten Strahlenschaden von Endothelzellen zu erklären. Damit würden aber für die vaskuläre Versorgung der repopulierenden Zellen im Rezidiv bis zum Eintritt in das makroskopische Wiederwachstum wie im vorbestrahlten Tumorbett abortive Endothelzellteilungen zur Verfügung stehen. Zudem kann für die frühe Phase der Repopulierung ein Zustand der 'Hypervaskularisation' durch existente größere Gefäße angenommen werden, der durch den Parenchymschwund von Tumorzellen entsteht und sowohl von Rubin und Casarett (42) als auch von Hilmas (18) bis zum 10. Tag nach Bestrahlung nachgewiesen wurde.

Der Vergleich der TBE-Versuche mit dem Rezidivwachstum in situ scheint demnach für das frühe Wachstum nur mit Einschrän-

kungen möglich. Hingegen weisen neben der Übereinstimmung der Wachstumsrate auch zahlreiche histologische Befunde auf eine identische Pathogenese des späten Rezidivwachstums und des Wachstums im vorbestrahlten Tumorbett hin. So stellten Gerte (14), Hilmas (18), Nelson (35) und Tenforde (56) in der Phase des retardierten Rezidivwachstums als wesentliche Veränderung im Tumor eine Zunahme der Nekroseanteile fest, die mit einer Abnahme der Tumordurchblutung, einer teilweisen Desorganisation der Vaskulatur sowie einer Erhöhung des Zellverlusts einherging. In den eigenen Ergebnissen konnte nicht nur der hohe Nekroseanteil im rezidivierenden HPM von ca. 2/3 des Gesamttumors, sondern auch das Muster der geweblichen Zusammensetzung aus einzelnen, mehr randständigen vitalen Inseln und großflächigen Nekrosearealen durch Transplantation in ein vorbestrahltes Tumorbett simuliert werden. Diese Beobachtungen unterstützen deshalb die Interpretation der Wachstumsretardierung in der Spätphase des Rezidivwachstums als Manifestation des TBE und unterstreichen damit eindrucksvoll die Bedeutung von Strahlenschäden des Gefäßbindegewebes für das Tumorwachstum nach Therapie.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Rezidive des Harding-Passey-Melanoms (HPM) der Maus nach Bestrahlung mit 30 Gy/ 300 kV Röntgenstrahlen zeigen wie andere experimentelle Tumorsysteme eine starke Wachstumsverlangsamung. Die Bedeutung von Tumorbett- und residualen Tumorzellschäden für dieses Verhalten wurde durch eine experimentelle Trennung der Wachstumsbedingungen untersucht: Unbehandelte Spendertumoren wurden in unbehandelte und mit 30 Gy/ 300 kV Röntgen bzw. 33 Gy/ 1 MeV Elektronen vorbestrahlte Situs der NMRI-Maus transplantiert. Die Intervalle zwischen Röntgenbestrahlung und Transplantation erfaßten einen Zeitraum von 3 Stunden sowie 6 bis 274 Tagen. In gleicher Weise erfolgte eine Retransplantation rezidivierender HPM in unbehandelte und vorbestrahlte Situs. Parallel hierzu wurden HPM in situ bestrahlt. Neben der Untersuchung des Wachstumsverlaufs wurden morphometrisch die Gewebszusammmensetzung und Histogenese sowie wachstumskinetisch das Proliferationsverhalten exemplarischer Gruppen analysiert.

In ein unbehandeltes Tumorbett retransplantierte Rezidive wuchsen mit der gleichen Wachstumsrate wie unbehandelte HPM, wiesen aber eine zusätzliche Latenz von 12 bis 13 Tagen auf. Die Transplantation unbehandelter HPM in ein vorbestrahltes Tumorbett führte im Sinne eines Tumorbetteffekts (TBE) zu einer Wachstumsverlangsamung, die sich in Abhängigkeit vom zeitlichen Abstand zur Bestrahlung sowie von der Tumorgröße in unterschiedlicher Stärke ausprägte. Für die Wachstumsphase zwischen 50 und 100 mg Tumorgewicht war die Wachstumsrate bei Intervallen von 3 Stunden und 6 Tagen nach Röntgenbestrahlung nur geringfügig um einen Faktor von 1,5 vermindert und erreichte eine maxi-

male Reduktion zwischen 50 und 150 Tagen nach Bestrahlung um einen Faktor von 3,5. Zwischen dem 200. und 300. Tag bildete sich diese Verminderung auf Werte um 1,4 bzw. 1,3 zurück. Während demnach Tumoren früher Intervalle bis zu einer Größe von 50 bis 100 mg relativ unbehindert wuchsen, unterlagen sie im Wachstumsbereich von 250 bis 500 mg 40 Tage nach Bestrahlung einer maximalen Verlangsamung um einen Faktor von 3,9 bis 5,6. Tumoren, die diese Größe ab dem 90. Tag nach Bestrahlung erreichten, erfuhren nur noch eine residuale Verminderung um Faktoren von 2,0. Rezidivtransplantate im vorbestrahlten Tumorbett zeigten einen ähnlichen Zeitverlauf des TBE. Die Untersuchung der Wachstumsbeeinflussung nach Transplantation in elektronenvorbestrahlte Situs von 15, 17,5 und 26 mm Durchmesser ergab keinen eindeutigen Hinweis auf eine Volumenabhängigkeit des TBE.

Experimente zur Histogenese von Transplantaten im vorbestrahlten Tumorbett deckten nach einer wie im unbehandelten Situs zwischen dem 3. und 5. Tag stattfindenden Vaskularisation ein unbehindertes Wachstum bis zu 10 mg (76 Tage-Intervall) bzw. 20 mg (175 Tage-Intervall) auf. Ab dieser Größe prägte sich der TBE abrupt aus. Gleichzeitig stiegen die Nekroseanteile dieser Tumoren rasch auf ein Plateau von 60 % bzw. 50 %. Autoradiographische Untersuchungen ergaben eine annähernd normale Zellproduktionsrate in den vitalen Anteilen dieser Tumoren, jedoch einen bereits ab 15 mg maximal erhöhten Zellverlust von 0,8. Diese Überhöhung betraf im vorbestrahlten Tumorbett vor allem den Verlust in die Nekrose. Retransplantierte Rezidive glichen in ihrer Histogenese und in ihrem Proliferationsverhalten dagegen unbehandelten Tumoren, wenn sie in ein unbehandeltes Tumorbett transplantiert wurden.

Das Wachstum 3 Stunden bzw. 6 Tage nach Vorbestrahlung des Tumorbetts transplantierter HPM entsprach in der späten Wachstumsphase dabei genau der verlangsamten Wachstumsrate von Lokalrezidiven. Ebenso wiesen Tumoren im vorbestrahlten Tumorbett die gleiche Gewebszusammensetzung und proliferationskinetischen Parameter wie Rezidive

in situ auf. Die späte Retardierung des Wachstums von Lokalrezidiven ist daher als Effekt der Tumorbettschädigung zu sehen.

Die Pathogenese des TBE wird als Strahlenschaden sowohl der Tumorbettkapillaren als auch größerer Gefäße interpretiert. Die experimentelle Untersuchung des TBE erlaubt somit auch eine Aussage über die Strahlenwirkung auf das Gefäßbindegewebe als einem wichtigen Normalgewebe.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. BARRANCO, S.C., M.M. ROMSDAHL, R.M. HUMPHREY: The Radiation Response of Human Malignant Melanoma Cells Grown in vitro. Cancer Res. 31, (1971), 830 - 833

2. BEGG, A.C.: Persönliche Mitteilung

3. BEGG, A.C.: The effect of Stromal Damage on the Response of Tumors to Irradiation and Chemotherapeutic Drugs. Radiat. Res. 83, (1980), 420 - 421

4. BREUR, K.: Growth Rate And Radiosensitivity Of Human Tumours: II. Radiosensitivity of Human Tumours. Europ. J. Cancer 2, (1966), 173 - 188

5. CHALKLEY, H.W.: Method for the quantitative morphologic analysis of tissues. J. Natl. Cancer Inst. 4, (1943), 47

6. CLIFTON, K. H., JIRTLE, R.: Mammary carcinoma cell population growth in preirradiated and unirradiated transplant sites. Radiology 117, (1975), 459 - 465

7. DENEKAMP, J.: Experimental Tumor Systems: Standardization Of Endpoints. Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys. 5, (1979), 1175 - 1184

8. DENEKAMP, J., J.F. FOWLER: Further investigations of the response of irradiated mouse skin. Int. J. Radiat. Biol. Vol. 10, 5, (1966), 435 - 441

9. DEWEY, D.L.: The radiosensitivity of melanoma cells in culture. Br. J. Radiology 44, (1971), 816

10. FOLKMAN, J., R. COTRAN: Relation Of Vascular Proliferation To Tumor Growth. Int. Rev. Exp. Path. Vol. 16, (1976), 208 -248

11. FOLKMAN, J.: Tumor Angiogenesis, in: Cancer - A comprehensive Treatise, Vol. 3: Biology of Tumors - Cellular Biology and Growth, Plenum Press, New York, (1975), 355 - 388

12. FOWLER, J.F., J. DENEKAMP: Skin reactions in mice after multifraction X-irradiation. Int. J. Radiat. Biol. Vol. 25, 3, (1974), 213 - 223

13. FRANKL, O., C.P. KIMBALL: Ueber die Beeinflussung von Mäusetumoren durch Roentgenstrahlen. Wiener Klin. Wochenschrift 45, (1914), 1418 - 1420

14. GERTE, M.: Untersuchungen zur Wachstumskinetik am rezidivierenden Harding-Passey-Melanom der Maus nach subkurativer Bestrahlung. Diss., Universität München, (1978)

15. GOODALL, C.M., A.G. SANDERS, P. SHUBIK: Studies of Vascular Patterns in Living Tumors With a Transparent Chamber Inserted in Hamster Cheek Pouch. J. Natl. Cancer Inst. Vol. 35, 3, (1965), 497 - 521

16. HARDING, H.E., R.D. PASSEY: A Transplantable Melanoma Of The Mouse. J. Bact. Path. 33, (1930), 417 - 427

17. HEWITT, H.B., E.R. BLAKE: The Growth Of Transplanted Murine Tumours In Pre-Irradiated Sites. Br. J. Cancer Vol. XXII, 4, (1968), 808 - 823

18. HILMAS, D.E., E.L. GILLETTE: Morphometric Analysis of the Microvasculature of Tumors During Regrowth and After X-Irradiation. Cancer Vol. 33, 1, (1974), 103 - 110

19. HIRST, D.G., J. DENEKAMP, E.L. TRAVIS: The response of mesenteric blood vessels to irradiation. Radiat. Res. 77, (1979), 259 - 275

20. HIRST, D.G.: Cell proliferation in irradiated blood vessels. Br. J. Radiol. 53, (1980), 516

21. HOPEWELL, J.W.: Early and Late Changes in the Functional Vascularity of the Hamster Cheek Pouch after local X-Irradiation. Radiat. Res. 63, (1975), 175 - 164

22. HOPEWELL, J.W., C.M.A. YOUNG: Changes in the Microcirculation of Normal Tissues after Irradiation. Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys. 4, (1978), 53 - 58

23. JIRTLE, R., K.H. CLIFTON: Effect of Preirradiation of the Tumour Bed on the Relative Vascular Space of Mouse Gastric Adenocarcinoma 328 and Mammary Adenocarcinoma 755. Cancer Res. 33, (1973), 764 - 768

24. JIRTLE, R., K.H. CLIFTON: Erythrokinetics In Mice Bearing Tumours In Either Preirradiated Or Unirradiated Tissue. Cell Tissue Kinetics 11, (1978), 581 - 596

25. JIRTLE, R., J.H.G. RANKIN, K.H. CLIFTON: Effect Of X-irradiation Of Tumour Bed On Tumour Blood Flow And Vascular Response To Drug. Br. J. Cancer 37, (1978), 1033 - 1038

26. JOLLES, B., P.C. KOLLER: The Role Of Connective Tissue In The Radiation Reaction Of Tumours. Br. J. Cancer 5, (1950), 77 - 89

27. KAHN, R.L., G. VERLY, N.S. MILLER, R. PRESSOIR, C.W. BUGGS: Antilocalization Of Cancer Cells Injected In Irradiated Area Of Rats. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 133, (1970), 1453 - 1455

28. KNIGHTON, D., D. AUSPRUNK, D. TAPPER, J. FOLKMAN: Avascular And Vascular Phases Of Tumour Growth In The Chick Embryo. Br. J. Cancer 35, (1975), 347 - 356

29. KUMMERMEHR, J.C.: Kurabilität des Harding-Passey-Melanoms durch Einzeitbestrahlung, Strahlentherapie 154, 8, (1978), 578 - 531

30. KURPESHEV, O.K., A.G. KONOPLIANNIKOV: Manifestations Of The 'Tumour Bed Effect' On Exposure To 252 Cf Gamma - Neutron Irradiation And to 60 Co Gamma - Rays. Med. Radiol. (Moskau) 22, 10, (1977), 83 -84

31. LAIRD, A.K.: Dynamics of Growth in Tumors and Normal Organisms. Natl. Cancer Inst. Monograph 30: Human Tumor Cell Kinetics., (1969), 15 - 28

32. MERWIN, R., G.H. ALGIRE: Transparent Chamber Observations Of The Response Of A Transplantable Mouse Mammary Tumor To Local Roentgen Irradiation. J. Natl. Cancer Inst. 2, (1950), 593 - 623

33. MERWIN, R., E.L. HILL: Effect Of Local Roentgen Irradiation On The Formation Of New Capillaries After Injury. J. Natl. Cancer Inst. 15, 4, (1955), 1031 - 1037

34. NELSON, J.S.R.: Growth Rate, Cell Cycle Kinetics And Transplantability Of C3HBA Mammary Tumors Regrowing After X-Irradiation. Radiat. Res. 62, (1975), 528

35. NELSON, J.S.R., R.E. CARPENTER, D. DURBORAW: Mechanisms Underlying Reduced Growth Rate In C3HBA Mammary Adenocarcinomas Recurring After Single Doses Of X-Rays Or Fast Neutrons. Cancer Res. 36, (1976), 524

36. O'BRIEN, P.H., C. SWEITZER, J.O. SHERMAN, W.T. MOSS: Tumor Bed Effect Of Ionizing Irradiation In Experimental Cancer Of The Colon. Cancer 23, (1969), 451 - 454

37. PAVICIC, S.: The Influence Of The Tumour Bed Irradiated With X-Rays On The Tumour Growth. Rad. Med. Fak. Zagrebu 21, (1973), 17 - 26

38. PAVICIC, F., S. PAVICIC: The Effect Of The Irradiation Of Tumor Bed On The Shedding Of Tumor Cells Of Fibrosarcoma Irradiated With 51 Cr In Mice. Lij. vjes. 97, (1975), 201

39. PEEL, S., D.M. COWEN: The Effect Of Cyclophophamide On The Growth And Cellular Kinetics Of A Transplantable Rat Fibrosarcoma. Br. J. Cancer 26, (1972), 304

40. REINHOLD, H.S., G.H. BUISMANN: Repair of radiation damage to capillary endothelium. Br. J. Radiology 48, (1975), 727 - 731

41. ROGERS, CH.C., E.E. STICKLEY, D.M. ROLLINS, C.D. MOSELEY: Influence Of Radiation Quality On Host Capability For Tumor Support Or Rejection. Radiology 90, 2, (1968), 358 - 360

42. RUBIN, PH., G.W. CASARETT: Microcirculation Of Tumors. Part II: The Supervascularized State Of Irradiated Regressing Tumors. Clin. Radiol. 17, (1966), 346 - 355

43. RUBIN, PH., G.W. CASARETT: Clinical Radiation Pathology, Vol. I, Vol. II. W.B. Saunders Company. Philadelphia, London, Toronto, (1968)

44. RUSS, S., G.M. SCOTT: The Effect Of X-Rays Upon Tumour Growth When The Tumour Itself Is Not Irradiated. Br. J. Radiology 13, (1940), 267 - 272

45. SCHLECHTWEG, K.: Zeitfaktoruntersuchungen der Strahlenwirkung auf das Harding-Passey-Melanom der Maus. Diss., Universität München, (1978)

46. SCOTT, O.C.A.: Some Aspects Of The Effect Of Ionizing Radiation On Tumors In Experimental Animals. Advances In Biological And Medical Physics, Vol. II, Academic Press New York, (1958), 121 - 174

47. SONG, C.W., J.H. SONG, J.J. CLEMENT, S.H. LEVITT: Vascular Changes in Neuroblastoma of Mice Following X-Irradiation. Cancer Res. 34, (1974), 2344 - 2350

48. STEEL, G.: Growth Kinetics Of Tumours: Cellpopulation kinetics in relation to the growth and treatment of cancer. Oxford University Press, (1977)

49. STENSTROM, K.W., H. VERMUND, D.G. MOSSER, J.F. MARVIN: Effects Of Roentgen Irradiation Of The Tumor Bed: 1. The Inhibiting Action of Local Pretransplantation Roentgen Irradiation (1500 r_a) on the Growth of Mouse Mammary Carcinoma. Radiat. Res. 2, (1950), 180 - 190

50. SUMMERS, W.C., K.H. CLIFTON, H. VERMUND: X-Irradiation of the Tumor Bed - I. A Study of the Indirect Actions of Radiation on Transplantable Tumors. Radiology 82, (1964), 691 - 703

51. SUMMERS, W.C.: A Model of Tumour Growth in Irradiated Hosts. Nature 205, (1965), 414

52. TAKAHASHI, M., R.F. KALLMANN: Quantitative Estimation Of Histological Changes In Subcutaneous Vasculature Of The Mouse After X-Irradiation. Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys. 2, (1977), 61 - 68

53. TANNOCK, I.F.: The Relation Between Cell Proliferation And The Vascular System In A Transplanted Mouse Mammary Tumour. Br. J. Cancer 22, 2, (1968), 258 - 273

54. TANNOCK, I.F.: Population Kinetics Of Carcinoma Cells, Capillary Endothelial Cells And Fibroblasts In A Transplanted Mouse Mammary Tumor. Cancer Res. 30, (1970), 2470 - 2476

55. TANNOCK, I.F., S. HAYASHI: The Proliferation Of Capillary Endothelial Cells. Cancer Res. 32, (1972), 77 - 82

56. TENFORDE, T.S., S.B. CURTIS, H.K. WOODRUFF, D.L. PARKS, S.J. DANIELS, K.E. CRABTREE, W.A. SCHILLING, R.J. DEGUZMAN: Studies on the regrowth rate, morphological characteristics and transplantation properties of rat rhabdomyosarcoma tumours following large doses of X-rays. Int. J. Radiat. Biol. 35, 6, (1979), 589 - 596

57. THOMLINSON, R.H., E.A. GRADDOCK: The Gross Response Of An Experimental Tumour To Single Doses Of X-Rays. Br. J. Cancer 21, (1967), 108 - 123

58. TROTT, K.R.: Das Proliferationsmuster unbestrahlter und Röntgenbestrahlter Säugetierzellen in vitro (Zeitraffermikrokinematographische Studien). Habilitationsschrift, Ludwig-Maximilians-Universität München, (1974)

59. TROTT, K.R., J. KUMMERMEHR, O. HUG, S. LUKACS, O. BRAUN-FALCO: Die Strahlenempfindlichkeit des amelanotischen Hamstermelanoms in vitro und in vivo. Strahlentherapie 154, (1978), 511 - 577

60. URANO, M., H.D. SUIT: Experimental Evaluation of Tumor Bed Effect for C3H Mouse Mammary Carcinoma and for C3H Mouse Fibrosarcoma. Rediat. Res. 45, (1971), 41 - 49

61. VAN DEN BRENK, H.A.S.: The Effect Of Ionizing Radiations On Capillary Sprouting And Vascular Remodelling In The Regenerating Repair Blastema Observed In The Rabbit Ear Chamber. Am. J. Roentgenol. 81, 5, (1959), 859 - 894

62. VAN DEN BRENK, H.A.S., C. SHARPINGTON, C. ORTON, M. STONE: Effects Of X-Irradiation On Growth And Function Of The Repair Blastema (Granulation Tissue). II. Measurements Of Angiogenesis In The Selye Pouch In The Rat. Int. J. Radiat. Biol. 25, (1974), 277 - 289

63. VERMUND, H., K.W. STENSTROM, D.G. MOSSER, E.A. JOHNSON: Effects Of Roentgen Irradiation Of The Tumor Bed. - 2. The Inhibiting Action Of Different Dose Levels Of Local Pretransplantation Roentgen Irradiation On The Growth Of Mouse Mammary Carcinoma. Radiat. Res. 5, (1956), 354 - 364

64. VERMUND, H., K.W. STENSTROM, D.G. MOSSER, M.K. LOKEN: Effects Of Roentgen Irradiation Of The Tumour Bed. - 3. The Different Inhibiting Action On The Growth Of Mouse Mammary Carcinoma Resulting From Pre- Or Post-Transplantation Irradiation. Radiat. Res. 8, (1958), 22 - 31

65. VON ESSEN, C.F.: Roentgen therapy of skin and lip carcinoma: Factors influencing success and failure. Am. J. Roentgenol. 83, (1960), 556

66. WACHSMANN, F., G. DREXLER: Graphs and Tables for Use in Radiology, 2nd edition. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, (1976), 132

67. WARREN, B.A., D. SHUBIK: The Growth of The Blood Supply to Melanoma Transplants in The Hamster Cheek Pouch. Lab. Invest. 15, 2, (1966), 464 - 478

68. WARREN, B.A., P. SHUBIK, R. WILSON, H. GARCIA, R. FELDMAN: The Microcirculation In Two Transplantable Melanomas Of The Hamster. I. In vivo Observations In Transparent Chambers. II. Scanning Electron Microscopy. Cancer Letters 4, (1978), 109 - 124

69. ZOLLINGER, H.U.: Die Strahlenvaskulopathie. Path. europ. 5, 2, (1970), 145 - 163

LEBENSLAUF

Am 23.01.1954 wurde ich, Ernst Holler, in Bad Reichenhall als Sohn des Polizeibeamten Josef Holler und seiner Frau Ida aus Freilassing geboren. Von 1960 bis 1964 besuchte ich dort die Volksschule, um 1964 an den Humanistischen Zweig des Karlsgymnasiums in Bad Reichenhall überzutreten. Im Juni 1973 legte ich an dieser Schule die Reifeprüfung ab und begann nach Ableistung meines Grundwehrdienstes das Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München im Sommersemester 1974.

Die Ärztliche Vorprüfung bestand ich im März 1976, den ersten Teil der Ärztlichen Prüfung im März 1977, den zweiten Teil im März 1979. Nach dem Praktischen Jahr legte ich im April und Mai 1980 den dritten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung mit Erfolg ab und erhielt am 8. Mai 1980 die Approbation als Arzt.

Im Dezember 1979 heiratete ich meine Frau Gisela. Seit September 1980 bin ich im Rahmen einer Anstellung am Sonderforschungsbereich 37 der Ludwig-Maximilians-Universität München am Institut für Hämatologie der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung tätig.